



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Animale

قسم : بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

Intitulé :

Association du polymorphisme G908R du gène *CARD15/NOD2* et la maladie de Crohn

Présentée et soutenue par : BENHAFED Khawla

Le : 03 /07/2017

DRIDI Amina

Jury d'évaluation :

- Présidente du jury :** BOUCHAR-ZIADA Hadia (MCB - UFM Constantine 1).
- Rapporteur :** DAOUI Zineb (MCB - Université de Batna 2).
- Co-encadreur :** Dr HAMMADA Talel (Professeur agrégé en Hépatocastro- Entérologie faculté de médecine Constantine).
- Examinatrice :** FERTOUL-GHARZOULI Razika (MCB - UFM Constantine 1).

*Année universitaire
2016 - 2017*

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photographies

Introduction 1

Etude bibliographique

I	Aspect clinique et épidémiologique de la M.C	2
1	Epidémiologie	2
1.1	Répartition mondiale de la M.C	2
1.2	Variations selon l'âge	3
1.3	Variations selon le sexe	3
2	Anatomie, physiologie et histologie du tube digestif	3
2.1	Anatomie et physiologie du tube digestif	3
2.1.1	Œsophage	3
2.1.2	Estomac	3
2.1.3	Intestin grêle	3
2.1.4	Gros intestin	4
2.2	Histologie du tube digestif	4
2.3	Barrières de protection du tube digestif	5
3	Diagnostic	6

3.1	Examen clinique	6
3.1.1	Manifestations générales	6
3.1.2	Manifestations digestives	6
3.1.3	Manifestations extra digestives	6
3.2	Examens biologiques	7
3.3	Examens sérologiques	7
3.4	Imageries médicales	7
3.5	Diagnostics différentiels	8
4	Classification	8
5	Etiologies de la M.C	9
5.1	Rôle de l'immunité	10
5.1.1	Immunité innée	10
5.1.2	Immunité acquise	11
5.2	Facteurs associés à l'environnement dans la M.C	11
5.2.1	Tabac	11
5.2.2	Facteurs psychologiques	12
5.2.3	Facteurs alimentaires	12
5.2.4	Antibiotiques	12
5.3	Facteurs génétiques	12
II	Génétique de la MC	13
1	Gene <i>CARD15/NOD2</i>	13
1.1	Structure et localisation chromosomique du gène <i>CARD15/NOD2</i>	13
1.2	Ligand de la protéine <i>CARD15/ NOD2</i>	14
1.3	fonction de la protéine <i>CARD15/NOD2</i>	14
1.4	Spectre mutationnel dans la MC	15
1.5	Rôle du <i>CARD15/NOD2</i> dans la MC	16
1.6	Implication de <i>CARD15/NOD2</i> dans d'autres maladies	16

2	Autres gènes candidats associés à la MC	17
3	Pharmacogénétique	18

Méthodologie

I	Population d'étude	19
1	Recrutement des patients	19
2	Recrutement des témoins	19
II	Méthodes	20
1	Extraction de l'ADN	20
1.1	Méthode d'extraction d'ADN	20
1.2	Evaluation qualitative de l'ADN	21
1.3	Evaluation quantitative de l'ADN	21
2	Amplification par PCR	22
2.1	Principe	22
2.2	Protocole de la PCR	23
2.2.1	Préparation du milieu réactionnel (mix)	23
2.2.2	Déroulement des cycles de la PCR	23
2.2.3	Contrôle des produits PCR	24
3	La digestion enzymatique des produits de PCR	25
3.1	Préparation de la digestion	25
3.2	Electrophorèse des produits de la digestion	25
4	Analyses statistiques	25

Résultats et discussion

1	Caractéristiques principales des patients	27
1.1	Age	27

1.2	Sex-ratio	28
1.3	Age et sex-ratio	28
1.4	Statut tabagique	29
1.5	Aspects cliniques : résultats	30
1.5.1	Manifestations générales	30
1.5.2	Manifestations digestives	31
1.5.3	Manifestations extra-digestives	31
1.6	Classification phénotypique	31
1.6.1	Age de diagnostic	31
1.6.2	Localisations anatomiques de la maladie	32
1.6.3	Intensité de la maladie	34
2	Polymorphisme G908R	35
2.1	Fréquences alléliques et génotypiques	35
2.2	Corrélation phénotype/génotype	37
2.2.1	Corrélation du polymorphisme G908R et la localisation de la MC	37
2.2.2	Corrélation du polymorphisme G908R et l'intensité de la MC	38
2.2.3	Corrélation du polymorphisme G908R et le tabac	38
2.2.4	Corrélation du polymorphisme G908R et les signes extra-digestifs	39
	Conclusion et perspectives	40
	Références bibliographiques	41
	Annexes	
	Résumé en français	
	Résumé en anglais	
	Résumé en arabe	



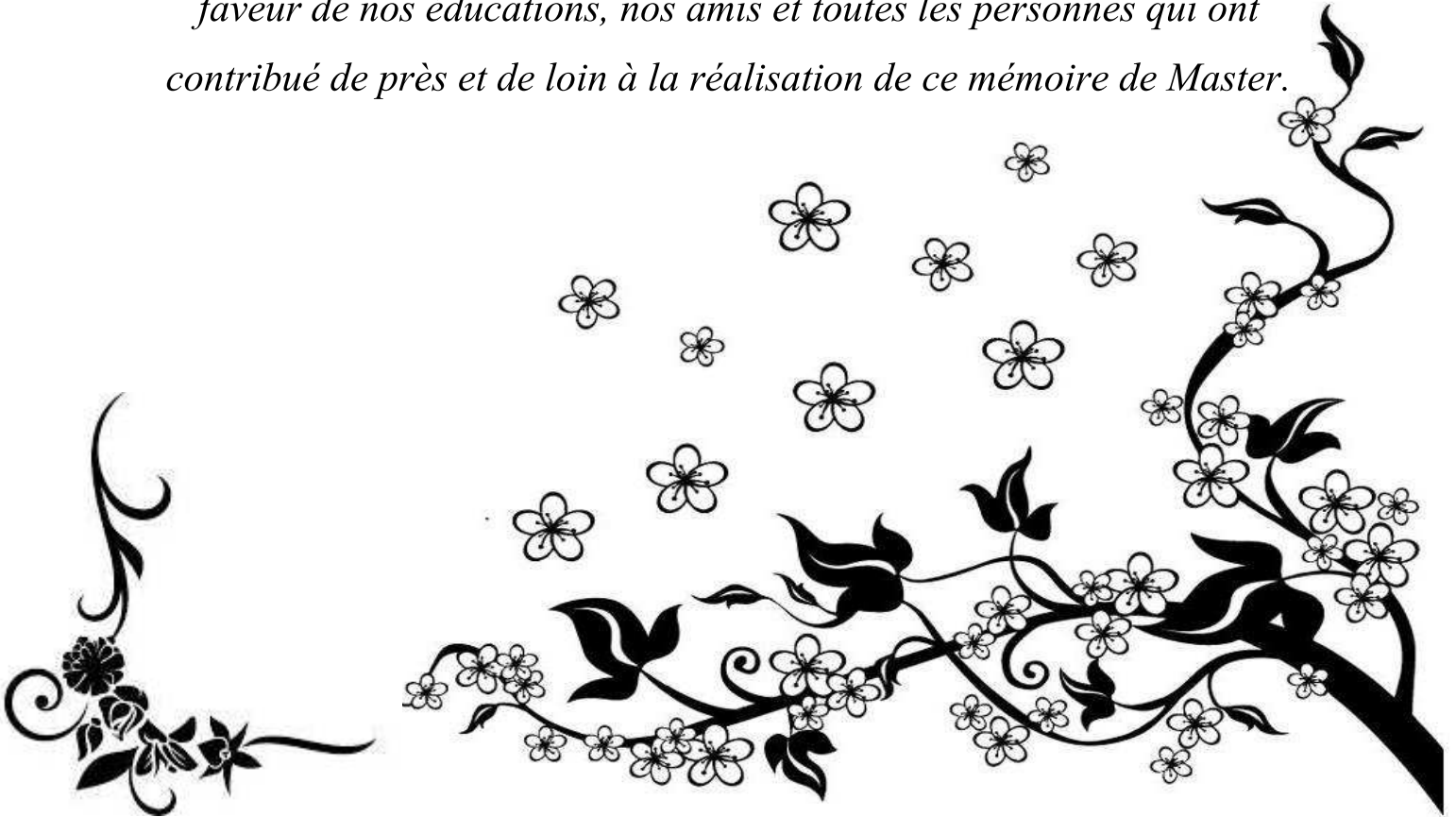
Remerciements

Nous remercions ALLAH le tout-puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience de mener à terme ce présent travail.

*Nous remercions aussi **Mme DAOUI Zineb**, l'encadreur de ce mémoire, pour son encadrement et pour son expérience et ses conseils.*

*Un grand merci à **Mme ZIADA Hadia** et **Mme FERTOUL Razika** pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail. Nous tenons aussi à remercier notre professeur **Mme SATTA Dallila** de l'université des frères Mentouri Constantine 1 pour sa générosité et ses précieux conseils ainsi que **Mme SEMMAM Ouarda** pour son aide.*

Nous remercions également nos parents pour tous leurs sacrifices en faveur de nos éducations, nos amis et toutes les personnes qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce mémoire de Master.



Dédicace

A qui m'as fait élever par une bonne éducation.

*A qui m'a allumé le chemin de savoir depuis mon enfance
jusqu'à ma soutenance pour que je puisse atteindre mon
objectif.*

A qui m'a procuré le confort, la paix et la béatitude éternelle.

A qui a tout fait pour moi.

Mes très chers parents que dieu les gardes.

A qui j'ai passé avec eux les meilleurs souvenirs de ma vie.

Mes frères et Sœurs.

*A qui m'ont partagé les bons et les mauvais moments pour
réussir ce travail.*

A ma petite et grande famille.

A mes chers amis.

Dridi

Amina

Dédicace

*Je dédie ce travail à l'âme de ma très chère **maman**.*

*À mon très cher **papa**, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ;*

Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi. Que dieu te garde inshallah

*À mon grand père **Naamane**.*

*À mes chères sœurs **Amel** et ses deux princesses **Sara** et **Rym, Rofia,***

Wafa** et **Rania

*À mon frère **Mohammed** et sa fiancée **Samah**.*

*À mes cousines **jouri** et **mira***

Pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral. Je vous souhaite beaucoup de succès, de joie, de bonheur et de santé dans votre vie.

À tous mes amis et collègues.

*À toutes la promotion de **Master 2 génétique moléculaire** : 2016-2017*

À tous ceux que j'ai pas pu citer.

À tous ceux que j'aime et à tous ceux qui m'aiment.

Merci à tous et merci d'être là pour moi.

***BENHAFED** Khawla*

LISTE DES ABREVIATIONS

ASCA	Anticorps anti-Saccharomyces cerevisia
BBP	Bleu de Bromophénol
BET	Bromure d’Ethidium
CARD15	Caspase Recruitment Domain-Containing Protein 15
CHU	Centre hospitalo-universitaire
CRP	C-Réactive Protéine
dNTP	DésoxyriboNucléotides-TriPhosphates
EDTA	Ethylen-Diamin_Tetra-acetic Acide
ELAM-1	Endothelial-Leukocytes Adhesion molecule1
GlcNAc	N-acétyl-glucosamine
IBD1	Inflammatory Bowel Disease 1
IFX	Infliximab
IκB	Inihibitory Protein-KB
IL-1	Intracellular adhesion molecule 1
IFNα	Interferon α
IFNγ	Interféron γ
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LAP	Lésions Ano- Périnéales
LPS	Lipopolysaccharides
LRR	Leucine Rich Repeat
LT	Lymphocytes T
MC	Maladie de Crohn

MDP	Muramyl dipeptide
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MurNAc	Acid N-acétyl-muramique
NBD	Nucléotide Binding Domaine
NFκB	Nuclear Factor Kappa B
NLR	NOD- like Receptors
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NOD2	Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2
OR	Odds Ratio
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
p-ANCA	Anticorps anticytoplasmique des polynucléaires neutrophiles
PCR	Polymerase chain reaction
PGN	Peptidoglycane
PRR	Pathogen Renognition Receptor
RCH	Rectocolite Hémorragique
RFLP	Fragment Length Polymorphism
RIP2	Receptor Interacting Protein 2
RLR	Retinoic acid inductible gene 1 Like Receptors
RR	Risque Relatif
SDS	Sodium Dodécyle Sulfate
TBE	Tris Borate EDTA
Th	Lymphocytes T-Helper (ou lymphocytes T auxiliaires)
TIR	Toll-Like Receptors
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptors

UV

Ultra-Violet

XBP1

X-Box Binding Protein 1

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Données épidémiologiques de la MC dans quelques pays au monde	2
Tableau 2	Classifications de Vienne et de Montréal	9
Tableau 3	Les amorces utilisées et la taille du produit de PCR	22
Tableau 4	Les composants du milieu réactionnel pour la PCR	23
Tableau 5	La programmation du thermocycleur	23
Tableau 6	Génotypage du polymorphisme G908R	25
Tableau 7	Tableau de contingence	26
Tableau 8	Répartition des patients par tranche d'âge	27
Tableau 9	Fréquences des patients fumeurs dans certaines études	30
Tableau 10	Localisation de la maladie selon certaines séries	33
Tableau 11	Représentation des fréquences alléliques de polymorphisme G908R du gène CARD15 chez la population témoins et malades	36
Tableau 12	Comparaison des fréquences des allèles mineurs du G908R chez certaines Populations	36
Tableau 13	Corrélation du polymorphisme G908R et la localisation de la MC	37
Tableau 14	Corrélation du polymorphisme G908R et l'intensité de la MC	38
Tableau 15	Corrélation du polymorphisme G908R et le tabac	38
Tableau 16	Corrélation du polymorphisme G908R et les signes extra-digestifs	39

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Structure du gène <i>CARD15/NOD2</i> et de protéine <i>CARD15/NOD2</i>	13
Figure 2	Sites mutationnelles du gène <i>CARD15/NOD2</i>	15
Figure 3	Rôle du <i>CARD15/NOD2</i> dans la MC	16
Figure 4	Gènes de susceptibilité (en noir) communs à plusieurs maladies (en rouge)	17
Figure 5	Répartition des patients par tranche d'âge	27
Figure 6	Répartition des patients selon le sexe	28
Figure 7	Répartition selon l'âge et le sexe	29
Figure 8	Répartition des malades selon le statut tabagique	30
Figure 9	Répartition des patients selon l'âge de diagnostic	32
Figure 10	Répartition des patients selon la localisation de la maladie	33
Figure 11	Répartition de l'intensité de la maladie	34

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photographie 1	Profil électro-phorétique de la PCR du polymorphisme G908R	24
Photographie 2	Profil de digestion des fragments du polymorphisme G908R	35

Introduction

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent deux principales formes : La maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Dans notre étude nous nous focaliserons sur la MC, qui est caractérisée par la présence des lésions inflammatoires, pouvant toucher tout ou une partie du tube digestif et par l'alternance de phases d'activité et de rémission, responsable d'une destruction progressive du tube digestif (Pearson *et al.*, 1995).

Elle a été identifiée pour la première fois en 1932 aux Etats-Unis par le docteur Burrill B. Crohn, comme une « iléite terminale ou régionale » à laquelle son nom fut donné (Crohn *et al.*, 1952). Elle affecte de façon prédominante, les sujets de race blanche, essentiellement, les pays les plus riches au monde, à savoir l'Europe et les Etats Unis, avec un taux de prévalence variant entre 25 et 199/100000 habitants (Yazdanyar *et al.*, 2009). En Algérie, l'épidémiologie de cette maladie est mal connue, mais une étude à été réalisée entre 2003 et 2007, a révélé une incidence de 5,87/100000 habitants et une prévalence de 19,02 (Hammada *et al.*, 2011).

Bien que la physiopathologie de la MC n'est pas entièrement élucidée, il est admis actuellement qu'il s'agit d'une maladie multifactorielle impliquant une susceptibilité génétique, une flore intestinale perturbée, un dysfonctionnement immunitaire et un rôle de l'environnement (Sartor, 2006; Zhang et Li, 2014).

Au fil des années, plusieurs gènes de susceptibilité ont été identifiés. Le gène *NOD2* (*nucleotide-binding oligomerization domain containing 2, alias CARD15: Caspase Recruitment Domain-Containing Protein 15*) situé sur le chromosome 16 (16q12), était le plus associé à la MC. Plus de 30 variants au sein du gène *CARD15/NOD2* ont été rapportés jusqu'à l'heure actuelle. Cependant, il a été démontré que trois principaux variants génétiques étaient associés à une augmentation du risque de la MC, Il s'agit des variants R702W, G908R et 1007fs qui représentent plus de 80% des mutations

Objectifs de notre travail :

- réaliser une enquête prospective auprès du service d'hépto-gastro-entérologie afin de recruter les patients diagnostiqués pour une MC.
- classer les patients selon les critères de Vienne.
- étudier les facteurs de risque de la MC.
- effectuer une analyse moléculaire du gène *CARD15/NOD2*, en étudiant le polymorphisme G908R.
- mettre en évidence l'association génotype/phénotype.

Etude bibliographique

I. Aspects cliniques et épidémiologiques de la MC

1. Epidémiologie

1.1. Répartition mondiale de la MC

Les études épidémiologiques réalisées au cours de ces 20 dernières années ont mis en évidence l'importance de la prévalence de la MC dans le monde (Tableau 1).

Tableau 1: Données épidémiologiques de la MC dans quelque pays au monde (in Daoui *et al.*, 2016).

Pays	Année	Population concernée	Prévalence (%)	Incidence
Croatie	2001	46,4/105 \approx 2000 patients	0,074	5,7/10 ⁵
Suède	2002	151/105 \approx 14500 patients	0,015	9,6/10 ⁵
Japon	2005	21,2/105 \approx 27100 patients	0,021	1,2/10 ⁵
Espagne	2005	116/105 \approx 54850 patients	0,11	7,3/10 ⁵
Brésil	2005	5,65/105 \approx 10500 patients	0,0056	3,5/10 ⁵
Chine	2006	3,5/105 \approx 46000 patients	0,0035	1/10 ⁵
France	2007	101/105 \approx 72500 patients	0,11	6,7/10 ⁵
Etat unis D'Amérique	2008	241,3/105 \approx 758000 patients	0,17	5,64/10 ⁵
Australie	2008	137,3/105 \approx 28000 patients	0,137	17,4/10 ⁵
Canada	2012	369,8/105 \approx 758000 patients	0,37	13,6/10 ⁵
Royaume uni	2012	181,8/105 \approx 115000 patients	0,18	9,56/10 ⁵
Inde	2012	Non renseigné	Non renseigné	0,14/10 ⁵

Etude bibliographique

1.2. Variations selon l'âge

La MC est une maladie de l'adulte jeune, la majorité des cas sont diagnostiqués entre 20 et 30 ans avec une médiane entre 27 et 29 ans. Néanmoins il existe des cas de la MC pédiatrique (Cortot *et al.*, 2009).

1.3. Variations selon le sexe

Dans la plupart des études, il y a une prédominance féminine ou il s'agit d'un risque de 20 à 30 % plus élevé que les hommes, la prédominance féminine concerne spécifiquement les femmes très jeunes, ce qui a suggéré l'intervention des facteurs hormonaux endogènes ou exogènes dans l'expression de la MC (Loftus, 2004).

2. Anatomie, physiologie et histologie du tube digestif

2.1. Anatomie et physiologie du tube digestif

Le tube digestif est un canal alimentaire, responsable du cheminement des aliments depuis la bouche jusqu'à l'anus, passant dans l'ordre par : L'œsophage, L'estomac, L'intestin grêle et Le gros intestin (Catala *et al.*, 2008).

2.1.1. L'œsophage

Tube musculaire situé dans le thorax derrière la trachée, qui relie le pharynx à l'estomac. Son rôle est de conduire le bol alimentaire jusqu'à l'estomac (Marzouki, 2014).

2.1.2. L'estomac

L'estomac est la portion du tube digestif en forme de J, situé dans l'abdomen sous le diaphragme. Sa partie inférieure est en continuité avec la première partie de l'intestin grêle : le duodénum. L'estomac est un réservoir où le bol alimentaire se transforme en chyme (Bommas-Ebert *et al.*, 2008).

2.1.3. L'intestin grêle

Cette partie du tube digestif a un diamètre de 4,5 cm pour une longueur de 6 m, ses différentes parties anatomiques sont le duodénum, le jéjunum et l'iléon.

L'intestin grêle à quatre fonctions :

- **fonction d'absorption** : absorption des produits de la digestion (glucides, lipides, protides, vitamines et l'eau).

Etude bibliographique

- **fonction endocrine** : certaines cellules de la muqueuse intestinale sécrètent des hormones qui agissent sur la sécrétion et la motricité intestinale.
- **fonction motrice** : progression de la nourriture dans le tube digestif grâce à des contractions des muscles.
- **fonction immunitaire** : sécrétion de diverses immunoglobulines qui jouent un rôle dans la défense bactérienne (Kohler, 2011).

2.1.4. Le gros intestin

Le colon, ou gros intestin, fait suite à l'intestin grêle au niveau de l'angle iléo-caecal, il mesure environ 1,5 m de long et comporte : le caecum, le colon ascendant, le colon transverse, le colon descendant, le colon sigmoïde et le rectum. Les fonctions du colon sont la déshydratation du bol alimentaire (absorption de l'eau et des électrolytes), la digestion de la cellulose et l'évacuation des déchets alimentaires (Catala *et al.*, 2008).

2.2. Histologie du tube digestif

A partir de l'œsophage la paroi du tube digestif contient, de la lumière du tube vers l'extérieur :

- **la muqueuse** : comporte un épithélium de revêtement sous forme cylindrique, contient du tissu lymphoïde, des glandes exocrines et aussi riche en vaisseaux ayant un rôle nutritif ou bien un rôle de récupération des nutriments liés à la fonction d'absorption.
- **la sous muqueuse** : est une paroi intermédiaire constituée d'un réseau vasculaire important alimentant les tissus entourant la paroi du tube digestif ainsi que des vaisseaux lymphatiques.
- **la musculuse** : elle a une disposition générale en deux couches de tissu musculaire lisse : circulaire interne et longitudinale externe, entre ces deux couches se situe le plexus nerveux d'Auerbach, La musculuse a pour principale fonction la motilité du tube digestif.
- **la séreuse** : la membrane la plus externe du tractus gastro-intestinale, elle représente une couche de protection du tube digestif en prolongement du péritoine qui tapisse la cavité abdominale (Kohler, 2011).

Etude bibliographique

L'épithélium de revêtement intestinal est un épithélium simple constitué de plusieurs types cellulaires, on y rencontre quatre types :

- les entérocytes
- les cellules caliciformes
- les cellules de paneth
- les cellules endocrines (Jaubert *et al.*, 2009).

2.3. Les barrières de protection du tube digestif

La barrière intestinale est étroitement liée à la flore bactérienne appelée microbiote intestinal et au système immunitaire. La densité microbienne dans le colon est estimée à 10^{11} - 10^{12} cellules par millilitre (Whitman *et al.*, 1998).

L'intestin et le colon doivent continuellement se protéger contre les bactéries, et ce sur une surface d'environ 200 m² que représente l'épithélium digestif (Hooper et Macpherson, 2010).

- ❖ **Barrière physique** : son rôle principale est le maintien d'une cohésion entre les cellules qui forment la couche épithéliale, la jonction entre ces cellules s'appelle jonction serrée et permet de maintenir la perméabilité intestinale (Rescigno *et al.*, 2001). La formation de jonctions serrées des cellules épithéliales est faite par les occludines qui sont des protéines transmembranaires (Ando *et al.*, 1996; Saitou *et al.*, 1997).
- ❖ **Barrière chimique**: comporte les peptides antimicrobiens et le mucus, ce dernier forme une couche qui varie proportionnellement avec la densité microbienne créant une barrière contre les agressions causées par le bol alimentaire, les microbes et les sous-produits bactériens (Johansson *et al.*, 2008).
- ❖ **Barrière cellulaire** : recrute des cellules immunitaires spécialisées, qui peuvent faire la distinction entre les micro-organismes pathogènes, de ceux qui sont bénéfique par les entérocytes de la barrière épithéliale (Lee *et al.*, 2006).

3. Diagnostic

Le diagnostic de la MC repose sur un faisceau d'arguments cliniques et paracliniques. Il est généralement établi lors des périodes de poussées (Singly et Camus, 2010).

3.1. Examen clinique

La nature et le siège des lésions au niveau du tube digestif vont déterminer les manifestations cliniques de la maladie qui peuvent être générales, digestives ou extra-digestives (Saussure et Bouhnik, 2007).

3.1.1. Manifestations générales

Sont représentés par une altération progressive de l'état générale avec asthénie, anorexie et amaigrissement. Ainsi la fièvre lors des poussées. Les signes de dénutrition sont liés au retentissement métabolique et nutritionnel de la maladie.

3.1.2. Manifestations digestives

A chaque localisation de la MC sont associés différents symptômes :

- formes iléocoliques droites : diarrhée plutôt hydrique, douleurs de la fosse iliaque droite parfois pseudo-syndrome appendiculaire ou palpation d'une masse droite.
- formes grêliques : possible syndrome occlusif avec syndrome de Koëning, douleurs d'intensité croissante soulagées par émissions de bruits hydroaériques.
- formes coliques : diarrhée sanglante accompagnée de douleur de type colique précédent l'émission de selles.
- formes anopérinéales : douleurs anales, ulcérations, fistules, ou abcès de l'anus (Singly et Camus, 2010).

3.1.3. Manifestations extra digestives

- **manifestations ostéo-articulaires** : les arthrites périphériques, les spondylarthrites ankylosantes et les sacro-iléite isolées.
- **manifestations cutané-muqueuses** : l'érythème noueux, Le pyoderma gangrenosum et les aphtes buccaux.
- **manifestations ophtalmologiques** : l'épisclérite et l'uvéite antérieure aigue qui sont fréquemment associées à l'atteinte articulaire.

Etude bibliographique

- **manifestations hépato-biliaire** : stéatose hépatique, pericholangite, hépatite granulomateuses, abcès hépatiques, cholangite sclérosante primitive et rarement lithiase biliaire, hépatite chronique active.
- **manifestations cardiovasculaires** : endocardites infectieuse, accidents thromboemboliques liés à un état d'hypercoagulabilité d'origine multifonctionnelle
- **autres manifestations** : broncho-pulmonaires (Alvéolite lymphocytaire, granulomatose pulmonaire,..), l'Amylose (hépatique et rénale) et la lithiase urinaire oxalique (Larsen *et al.*, 2010) (Annexe 1).

3.2. Examens biologiques

Des anomalies biologiques sont souvent associées telles qu'un syndrome inflammatoire (élévation de la CRP, augmentation des polynucléaires neutrophiles sanguins, thrombocytose), une anémie microcytaire de mécanisme inflammatoire et par perte sanguine (Laass *et al.*, 2014).

3.3. Examens sérologiques

D'un point de vue sérologique, deux types d'anticorps peuvent orienter le diagnostic des MICI: les pANCA (anticorps antineutrophiles cytoplasmiques avec fluorescence périnucléaire) et les ASCA (anticorps anti-Saccharomyces cerevisiae) (Bouhnik, 2005).

3.4. Imageries médicales

- ❖ **Endoscopie** : l'endoscopie joue un rôle important dans la prise en charge des patients atteints par la MC. Elle donne une vision directe à la paroi intestinale et permet de réaliser des biopsies étagées afin d'apprécier l'extension des lésions (Conti *et al.*, 2017).
- ❖ **Vidécapsule endoscopique** : c'est une technique innovante non invasive qui permet grâce à une caméra miniaturisée avalée par le patient d'obtenir un film de la muqueuse digestive (Rahmi, 2016).

Etude bibliographique

❖ Radiologie

- **Échographie** : montre l'épaississement pariétal de la paroi colique sans perte de la différenciation des couches et sans anomalie de la graisse péri-rectocolique (Boudiaf *et al.*, 2004).
- **Scanner** : il est actuellement la méthode d'imagerie en coupe de référence pour détecter les complications abdominales liées à la MC, permettant l'étude de l'ensemble de la cavité abdomino-pelvienne en quelques secondes avec l'obtention d'une qualité d'image ayant une résolution spatiale très élevée (Boudiaf *et al.*, 2000).
- **IRM** : (Imagerie par Résonance Magnétique) semble utile pour le suivi évolutif des malades atteints d'une MC. Il faudra néanmoins résoudre les inconvénients liés au coût et à l'accessibilité aux machines (Lomas et Graves, 1999).

3.5. Diagnostic différentiel

Il doit être envisagé en fonction des situations cliniques et de la localisation des lésions.

- La forme iléale de la MC doit être différenciée d'une appendicite aiguë, d'une iléite infection ou encore d'un lymphome intestinal.
- Les formes jéjunales ou iléales étendues sont fréquemment confondues avec la forme intestinale de la tuberculose, les lymphomes, la maladie cœliaque ou encore la maladie de Whipple.
- Les formes iléocoliques chroniques peuvent être confondues avec des vascularites ou des entéropathies ischémiques (Singly et Camus, 2010).
- Dans 10 à 20 % des premières poussées de MICI de type colite isolée, il n'est pas possible de faire la distinction entre une MC et une RCH : on parle alors de colite indéterminée (Laass *et al.*, 2014) (Annexe 2).

4. Classification

Une classification de Vienne a été publiée en 1991 pour permettre aux cliniciens de typer la maladie. Cette classification se base sur la distribution anatomique, l'âge de diagnostic et le phénotype de la maladie. Celle-ci a été révisée par le congrès de gastroentérologie en 1998, et remplacée par la classification de Montréal. Les trois paramètres principaux n'ont pas été changés, mais des ajouts ont été réalisés pour permettre une typologie plus précise de la

Etude bibliographique

maladie et plus adaptée à la pratique clinique. Cette classification permet de classer les différents degrés de sévérité de la maladie (Satsangi *et al.*, 2006).

Tableau 2 : Classifications de Vienne et de Montréal (Satsangi *et al.*, 2006) .

	VIENNE	MONTREAL
Age du diagnostic	A1 : Avant 40 ans A2 : Après 40 ans	A1 : Avant 16 ans A2 : Entre 17 et 40 ans A3 : Autour de 40 ans
Localisation (Topographie)	L1 : Iléale L2 : Colique L3 Iléocolique L4 : Tractus gastro-intestinal supérieur	L1 : Iléale L2 : Colique L3 : Iléocolique L4 : Tractus gastro-intestinal supérieur isolé*
Intensité (Phénotype)	B1 : Non sténosante, non perforante B2 : Sténosante B3 : Fistulisante	B1 : Non sténosante, non perforante B2 : Sténosante B3 : Perforante P= atteinte anopérinéale **

*L4 peut être ajouté à L1-L3 et n'est pas exclusif

** P peut être ajouté à B1-B3 quand une atteinte anopérinéale est présente.

5. Etiologie de la MC

L'origine de la MC est multifactorielle avec trois principaux facteurs : la susceptibilité génétique, les facteurs environnementaux et le microbiote intestinal conduisant à une réponse immunitaire anormale tant quantitativement que qualitativement. Ceci conduit à l'apparition d'une inflammation microscopique, puis aux lésions visibles en endoscopie et en imagerie. Les facteurs environnementaux (tabac, médicaments...) aggravent ou déclenchent la réponse immunitaire anormale de la muqueuse intestinale envers sa microflore (Cortot *et al.*, 2009).

Etude bibliographique

5.1. Rôle de l'immunité

Le système immunitaire permet une protection de l'organisme envers une large variété d'agents étrangers. Il induit deux types de réponses de défense : la réponse innée et la réponse acquise ou adaptative.

La réponse immunitaire innée représente la première ligne de défense contre les infections et permet également le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative (Wallace *et al.*, 2014).

5.1.1. L'immunité innée

Le système immunitaire inné déclenche une réponse rapide mais non spécifique face aux agents microbiens. Les molécules qu'ils portent à leur surface sont reconnues par des récepteurs, les TLR (Toll-like receptors) et les TNFR (tumor necrosis factor receptors), présents à la surface des cellules épithéliales de l'intestin qui déclenchent les mécanismes de réponse du système immunitaire inné en cas d'invasions pathogènes. Un de ces mécanismes est l'activation de la voie NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B) (Elewaut *et al.*, 1999). C'est un facteur de transcription dimérique formé des sous-unités p50 et p65. Dans les cellules au repos, NF- κ B est maintenu dans le cytoplasme par son association avec son inhibiteur I κ B, qui masque le signal de localisation nucléaire (Hayden et Ghosh, 2008).

Les cellules immunitaires, comme les monocytes/macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques peuvent être stimulées par des cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1 (intercellular adhesion molecule 1) et le TNF α , et par des polysaccharides et peptides des micro-organismes, comme le LPS (Lipopolysaccharide) et la flagelline, qui s'associent aux divers récepteurs du système immunitaires comme les TLR et les TNFR (Ghosh et Karin, 2002; Thome *et al.*, 2010).

L'activation de NF- κ B mène à l'augmentation de la transcription des gènes qui encodent pour des chimiokines, des cytokines, des molécules d'adhésion comme l'IL-1, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) et ELAM-1 (endothelial-leukocytes adhesion molecule 1) ainsi que des inhibiteurs de l'apoptose (Van Antwerp *et al.*, 1996; Ghosh *et al.*, 1998).

Certaines de ces molécules ont un pouvoir chimiotactique et sont nécessaires pour stimuler les cellules inflammatoires et phagocytaires à migrer vers le tissu où NF- κ B est activé (Ghosh et Karin, 2002; Sun *et al.*, 2004).

Une inhibition excessive de NF- κ B amène une augmentation de la mort cellulaire des entérocytes et une diminution de l'expression des peptides antimicrobiens. Ceci perturbe la

Etude bibliographique

barrière épithéliale et permet aux bactéries commensales d'envahir la muqueuse et engendrer une colite chronique et sévère (Nenci *et al.*, 2007).

Donc, la voie NF- κ B se doit d'être finement régulée afin de maintenir une homéostasie de la réponse immunitaire inflammatoire.

5.1.2. L'immunité acquise

La réponse immunitaire acquise met en jeu les lymphocytes B et T qui, produisent des effecteurs : cytokines et anticorps. A l'inverse de la réponse innée, cette réponse est hautement spécifique et confère une immunité de longue durée. Les lymphocytes T naïfs (Th0) sont capables, après activation, de se différencier en lymphocytes Th1, ou en lymphocytes Th17 fortement impliqués dans la MC. Les lymphocytes Th1 provoquent la sécrétion de grandes quantités d'IFN- γ (interféron- γ), de TNF- α et d'IL-12. Les lymphocytes Th17 joue un rôle dans la pathogénèse de la MC (Bouladoux *et al.*, 2013). La production de cytokines pro-inflammatoires et de cytokines anti-inflammatoires est déséquilibrée chez les patients atteints de MC. La production de cytokines par les lymphocytes Th1 et Th17 est augmentée tandis que les lymphocytes régulateurs sont inhibés et produisent des quantités plus faibles de cytokines anti-inflammatoires (IL10) chez les patients atteints de MC. De même que la réponse immunitaire de Th1 aboutit à l'activation des macrophages et à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1, l'IL6 ou le TNF, responsable de l'inflammation chronique digestive (Matricon, 2010).

5.2. Facteurs associés à l'environnement dans la MC

Les mécanismes par lesquels ces facteurs environnementaux induisent ou réactivent une MC ne sont pas encore bien compris. De façon générale, ces facteurs pourraient altérer l'intégrité de la muqueuse, la réponse immunitaire ou la flore intestinale et favoriser l'inflammation.

5.2.1. Tabac

Le tabac reste le facteur le plus largement étudié dans la MC. Cependant, il ne semble pas être responsable à lui seul de l'augmentation de la maladie. En effet, dans les pays à gros pourcentage de fumeurs comme l'Asie et l'Afrique, l'incidence de la maladie est peu élevée ; alors que dans les pays à faible pourcentage de fumeurs comme le Canada et la Suède, l'incidence de la maladie est élevée (Cortot *et al.*, 2009; Shanahan et Bernstein, 2009).

Etude bibliographique

5.2.2. Facteurs psychologique

Le stress a longtemps été proposé comme facteur de risque dans la pathogenèse des MICI. L'étude rétrospective de Goodhand et al a montrée une réduction des rechutes symptomatiques chez les patients traités par des antidépresseurs. Cependant le lien de causalité entre stress et la MC reste à démontrer (Goodhand *et al.*, 2012).

5.2.3. Facteurs alimentaires

Les différents composés alimentaires pourraient agir soit directement sur le système immunitaire intestinal, soit en modifiant la composition de la flore intestinale. Des études ont montré que l'augmentation de consommation des produits industriels, de graisse animale et surtout de sucre (RR : 3,4 - 4,6), ainsi que les microparticules issues de la pollution pouvaient concourir à l'apparition de la MC (Bernstein et Shanahan, 2008) .

5.2.4. Antibiotiques

L'augmentation de l'utilisation des antibiotiques durant les 50 dernières années dans les pays industrialisés est corrélée à l'augmentation de cas de MC. Les antibiotiques sont connus pour être des perturbateurs temporaires de la flore intestinale, entraînant un rebond anarchique de cette flore après l'arrêt du traitement. Ce déséquilibre peut perdurer plusieurs mois selon la durée et l'intensité du traitement (Swidsinski et al., 2008).

Une étude récente a montré qu'une semaine après l'arrêt d'un traitement antibiotique ayant provoqué une perturbation profonde du microbiote, la flore intestinale tendait à retrouver un état stable mais montrait une composition différente de l'état initial (Dethlefsen et Relman, 2011).

5.3. Facteurs génétiques

L'aspect génétique de la MC a toujours été une hypothèse très étudiée. En effet, 10 à 29% des patients atteints de MC présentent un antécédent familial (Cooney et Jewell, 2009). Des études ont montré que le fait d'avoir un frère ou une sœur atteint de la MC augmentait le risque relatif (RR) d'un facteur de 30 à 40, et que la comorbidité était plus élevée chez les vrais jumeaux (50-58%) par rapport aux faux jumeaux (0-12%) (Binder, 1998). Ces observations indiquent clairement l'existence de facteurs de prédisposition génétiques.

II. Génétique de la MC

1. Gene *CARD15/NOD2*

1.1. Structure et localisation chromosomique du gène *CARD15/NOD2*

La première étude « génome entier » pour la MC a été effectuée par Hugot et al (1996), mettant en évidence une association entre une région péri-centromérique du chromosome 16 en q12 (*IBD1* : *Inflammatory bowel disease 1*) et la MC. Cette association fut ensuite confirmée par une large étude européenne (Curran *et al.*, 1998). Cette découverte fut la première confirmation moléculaire d'une contribution génétique à la MC. De nombreuses études ont, par la suite, largement validé cette association qui est spécifique de la MC.

En 2001, le gène *CARD15/NOD2* fut découvert et il reste aujourd'hui le principal gène clairement associé à la MC.

Le gène *CARD15/NOD2* contient douze exons et code pour une protéine intra-cytoplasmique de 1044 acides aminés. Cette protéine contient plusieurs domaines partagés avec d'autres protéines : un domaine N-terminal CARD, un domaine central NBD (*Nucléotide Binding Domaine*) et un domaine C-terminal riche en leucine LRR (*Leucine Rich Repeat*) (Hugot *et al.*, 2001) (Figure1).

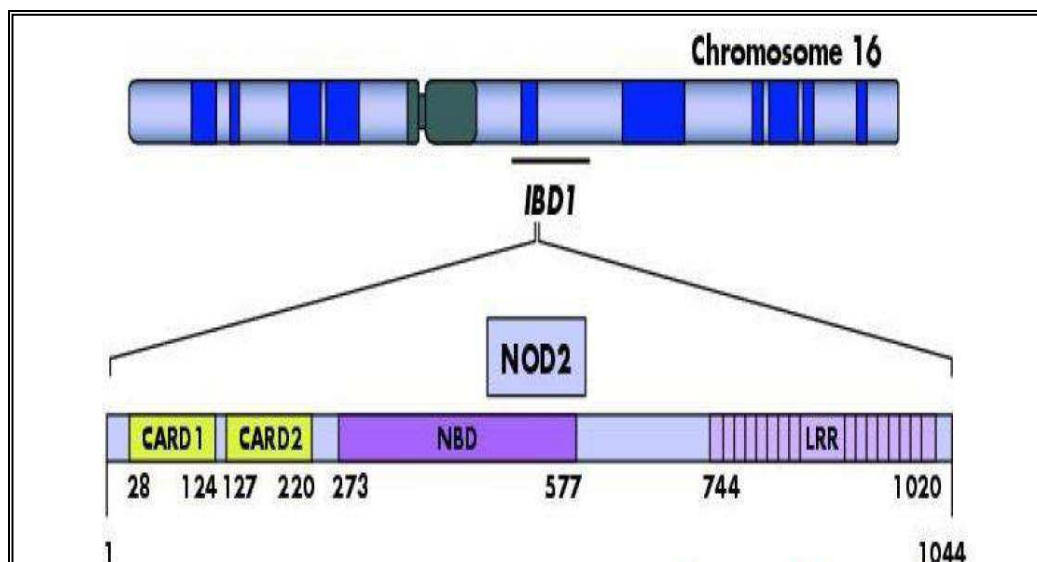


Figure 1: Structure du gène *CARD15/NOD2* et de protéine *CARD15/NOD2* (Hugot *et al.*, 2001)

Etude bibliographique

1.2. Ligand de la protéine CARD15/NOD2

La protéine CARD15/NOD2 appartient à une famille des protéines, les PRR (*Pathogen Recognition Receptor*) impliquées dans la réponse immunitaire innée de l'hôte vis-à-vis des agents bactériens et des virus. Trois grandes familles de PRR : les TLR (*Toll Like Receptors*) situés dans la membrane cellulaire, les RLR (*Retinoic acid inducible gene1 Like Receptors*) impliqués dans la reconnaissance des virus et les NLR (*NOD-like Receptors*) caractérisés par la présence d'un domaine LRR et d'un domaine NOD.

La protéine CARD15/NOD2 possède la structure caractéristique des protéines NLR : un domaine N-terminal CARD, un domaine central NACHT ou NOD et un domaine C-terminal riche en leucine LRR (Tanabe *et al.*, 2004).

Le gène *CARD15/NOD2* code un récepteur intra cytoplasmique de la famille des NLR impliqués dans la reconnaissance des PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns), qui sont des composants spécifiques du monde microbien, pas ou peu polymorphes, parmi lesquels on trouve le PGN (peptidoglycane) et le LPS.

Le PGN est présent chez la très grande majorité des bactéries où il intervient dans la rigidité de la paroi bactérienne. Il forme une enveloppe fine chez les bactéries à Gram négatif et une enveloppe épaisse chez les bactéries à Gram positif. Il est formé de chaînes de composés glucidiques alternant un MurNAc (acide N-acétyl-muramique) et un GlcNAc (N-acetyl-glucosamine) reliées par des peptides qui peuvent être réunis en ponts (Girardin *et al.*, 2003).

1.3. Fonction de la protéine CARD15/NOD2

Les récepteurs NOD2 font parties des PRR et reconnaissent des motifs bactériens spécifiques. C'est la liaison du domaine LRR avec son ligand le MDP (muramyl dipeptide), dérivé des PGN de la paroi bactérienne qui libère le site actif NOD/NACHT de la protéine.

Le domaine NOD, qui constitue le domaine catalytique de la protéine, est capable de lier un nucléotide de type ATP. L'activation de la protéine CARD15/NOD2 par le MDP entraîne donc une dimérisation de NOD2 par le domaine NOD.

Le domaine CARD est le domaine effecteur, il permet la transmission du signal, notamment par son interaction avec la protéine Rip2 (*Receptor interacting protein 2*) intervenant dans la cascade pro-inflammatoire NF- κ B.

Ces voies jouent un rôle central dans la sécrétion de molécules pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, TNF, IL-5...) et anti-inflammatoires (IL-10). En situation normale, la stimulation de NOD2 par le MDP oriente plutôt la réponse immunitaire vers un profil Th2, caractérisé par

Etude bibliographique

l'expression de l'IL-5 et l'IL-4, tandis que la stimulation des TLR par le LPS entraîne l'expression de cytokines caractéristiques d'un profil Th1 (TNF, IL-6...) (Magalhaes *et al.*, 2008).

Perez et al (2010) montrent que la protéine CARD15/NOD2 possède une activité antibactérienne propre, via son interaction directe avec le MDP bactérien.

CARD15/NOD2 intervient aussi dans d'autres mécanismes de défense contre les bactéries invasives. Des études montrent que l'activation de CARD15/NOD2 est indispensable au mécanisme de l'autophagie dans les cellules dendritiques et les macrophages (Travassos *et al.*, 2010).

1.4. Spectre mutationnel dans la MC

L'analyse détaillée du gène *CARD15/NOD2* a révélé trois polymorphismes associés indépendamment à la MC, et correspondant, respectivement, à deux mutations faux-sens non conservatrice (R702W et G908R) et à une mutation décalante (1007Fs) (Lesage *et al.*, 2002).

- ❖ **R702W**: est une substitution de thymine en cytosine en position 2104 sur l'exon 4 et donne lieu à un changement de l'acide aminé Arginine en tryptophane en position 702 de la protéine.
- ❖ **G908R** : est une substitution de guanine en cytosine en position 2722 sur l'exon 8, et responsable d'un changement de glycine en arginine.
- ❖ **1007fs** : est une insertion de cytosine en position 3020 résultant d'un codon stop, cette mutation générant une protéine tronquée de 32 acides aminés (Figure 2).

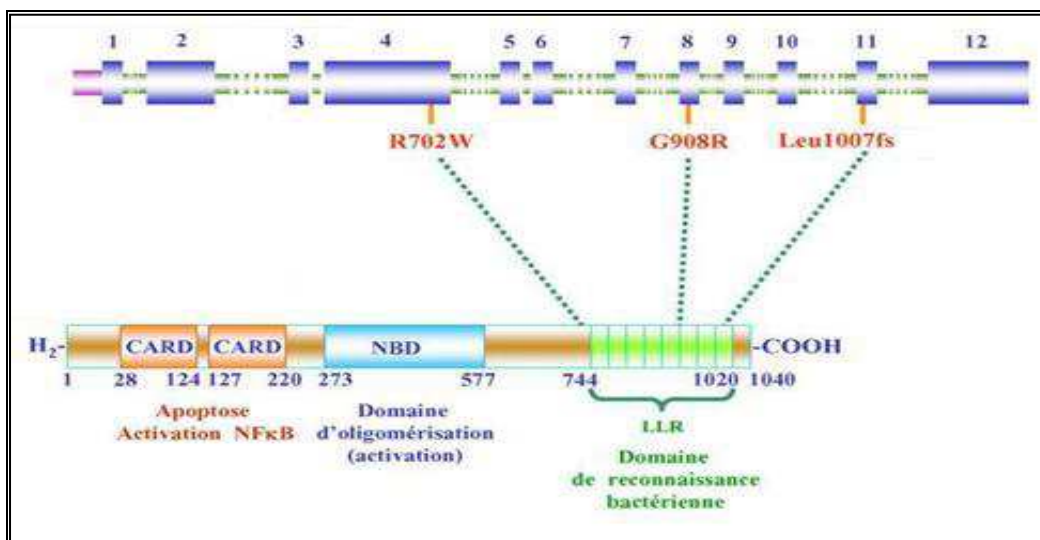


Figure 2 : Sites mutationnelles du gène *CARD15/NOD2* (Hugot *et al.*, 2001)

Etude bibliographique

1.5. Rôle du CARD15/NOD2 dans la MC

Il a été postulé par de nombreux groupes que les mutations de *CARD15/NOD2* entraînent une perte de fonction responsable de la maladie, impliquant une perte de réponse de la protéine CARD15/NOD2 pour le MDP, renforçant l'idée d'un défaut de clairance bactérienne dans le déclenchement de la maladie. Ce défaut de clairance peut se traduire par une augmentation de la translocation bactérienne vers les ganglions mésentériques. La perte de fonction du domaine LRR due à la mutation 1007fsinsC empêcherait la reconnaissance du MDP par la protéine et donc préviendrait l'activation de la cascade NF- κ B (Kobayashi *et al.*, 2005; Bruns *et al.*, 2012) (Figure 3).

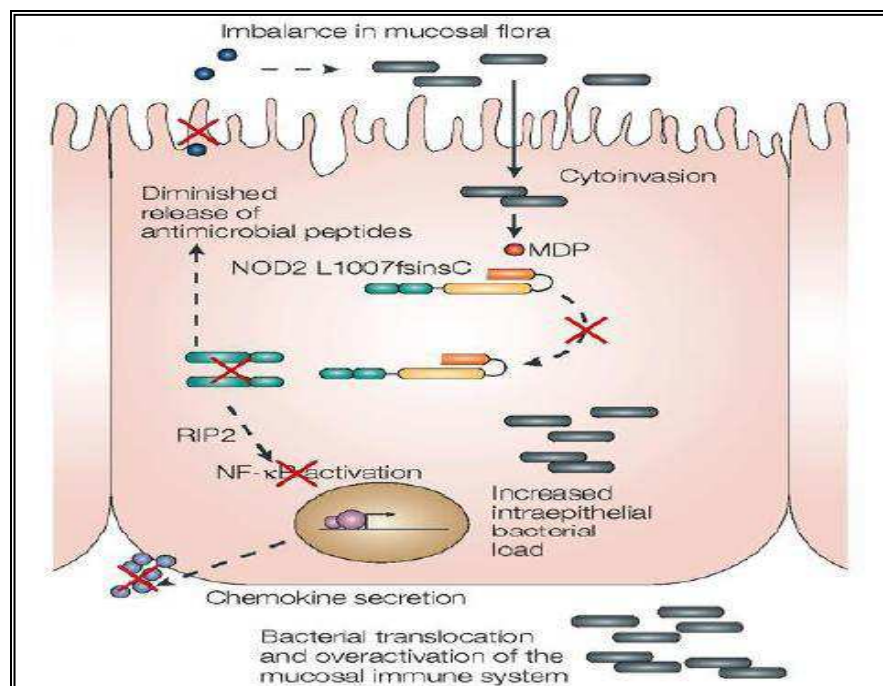


Figure 3 : Rôle du CARD15/NOD2 dans la MC (Schreiber *et al.*, 2005).

La perte de fonction conduirait aussi à une diminution de l'expression des défensines, des peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules de Paneth au niveau de l'iléon qui interviennent dans le maintien de l'homéostasie intestinale (Wehkamp *et al.*, 2004).

1.6. Implication de *CARD15/NOD2* dans d'autres maladies

Les mutations du gène *CARD15/NOD2* sont impliquées dans de nombreuses maladies rares notées dans la figure 4.

Etude bibliographique

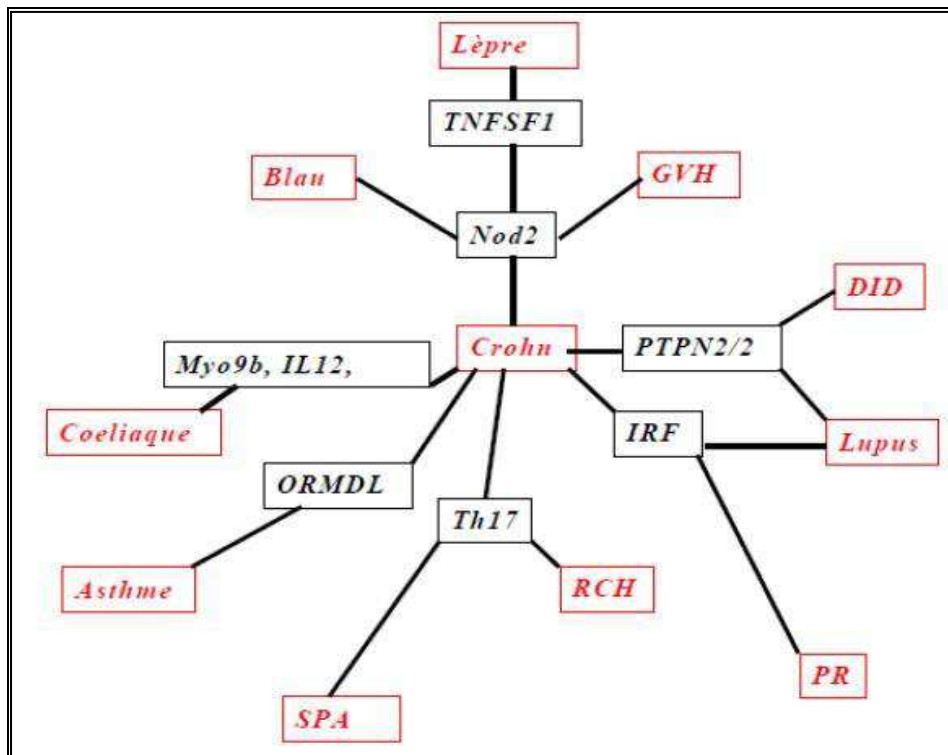


Figure 4 : Gènes de susceptibilité (en noir) communs à plusieurs maladies (en rouge).
PR : polyarthrite rhumatoïde; SPA : spondyloarthropathies; DID : Diabète insulino-dépendant. GVH : réaction de greffon contre l'hôte (Hugot, 2006).

2. Autres gènes candidats associés à la MC

Plusieurs autres gènes de l'immunité ont été associés à la MC. Parmi les plus importants :

- les gènes situés sur le locus IBD5 codant pour les IL-3, 4, 5 et 113 (Rioux *et al.*, 2001).
- le gène *XBPI* codant un facteur de transcription impliqué dans le stress du réticulum endoplasmique et dont l'inactivation provoque l'appose des cellules de Paneth (Kaser *et al.*, 2008).
- le gène codant NLRP3, une protéine constituant l'inflammasome (Villani *et al.*, 2009).
- certains gènes impliqués dans la réponse Th17 et des gènes codant pour le récepteur de la cytokine pro-inflammatoire IL-23, dont l'expression est augmentée dans la MC (Duerr *et al.*, 2006).

3. Pharmacogénétique

Les études réalisées dans le domaine de la pharmacogénétique contribueront sans aucun doute à une meilleure gestion thérapeutique des MICI. La réponse thérapeutique à un médicament est extrêmement variable selon les individus, tant au niveau de son efficacité qu'au niveau de sa toxicité.

Depuis quelques années, des thérapies biologiques sont développées, ciblant spécifiquement des molécules essentielles à l'inflammation. Parmi ces agents thérapeutiques, l'IFX (Infliximab), un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre le TNF-alpha humain, dans le traitement de la MC. La reproductibilité dans le temps de la réponse ou de la non-réponse au traitement chez un patient donné laisse à penser que des facteurs génétiques sont impliqués dans cette différence de réponse thérapeutique inter-individuelle (Medrano *et al.*, 2015).

La découverte des facteurs génétiques associés à ces pathologies et à leur thérapeutique s'accélère. Néanmoins les retombées cliniques de ces recherches restent aujourd'hui limitées (Bourgain, 2014).

I. Population d'étude

1. Recrutement des patients

Notre étude transversale de type cas-témoins a inclus 15 patients atteints de la MC, recrutés au niveau du service d'Hépatogastro-entérologie au Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Benbadis de Constantine.

Ce recrutement a été basé sur le diagnostic positif qui a été réalisé par le médecin traitant. Le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments cliniques, endoscopiques, radiologiques, anatomo-pathologiques et évolutifs.

Les patients ont bénéficié d'un prélèvement sanguin sur deux tubes de 5ml, vacutainer et contenant l'anticoagulant EDTA (*Ethylène-Diamine tétra-acétique Acide*), après avoir reçu des explications sur les procédures et les objectifs de l'étude, et après avoir signé un consentement éclairé (Annexe 3). Une enquête épidémiologique associée à une analyse des dossiers a été réalisée pour tous les patients recrutés (Annexe 4).

Notre étude s'est étendue du mois d'Avril à Juin 2017, la sélection de ces patients a été faite en respectant des critères bien définis.

❖ Critères d'inclusion

- Patients âgés de plus de 15 ans.
- Patients suivis pour une MC, quelque soit le stade évolutif et la localisation de la maladie.

❖ Critères d'exclusion

- RCH
- Colites inclassables.

2. Recrutement des témoins

Cette partie d'étude a concerné 25 échantillons d'ADN collectés de la banque d'ADN du laboratoire de biologie et génétique moléculaire (de l'université Constantine 3). Les ADN choisis sont spécifiques aux sujets supposés sains et ne présentant aucun antécédents personnels ou familiaux de la MC.

II. Méthodes

Nous avons utilisé la technique de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism*) avec l'algorithme de travail suivant :

- extraction de l'ADN.
- amplification du gène *CARD15/NOD2* par PCR.
- contrôle des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.
- digestion enzymatique des produits de PCR par l'enzyme de restriction HhaI pour évaluer le polymorphisme G908R du gène *CARD15/NOD2*.
- finalement l'analyse des produits de digestion par électrophorèse sur gel d'agarose à 3%.

1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est une technique qui isole l'ADN à partir d'une cellule en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse, les leucocytes sanguins représentent la source majeure de l'ADN.

Les méthodes d'extraction des acides nucléiques sont diverses, dans la grande majorité des cas, la technique d'extraction des acides nucléiques doit être adaptée à l'échantillon et la nature du génome. Au cours de cette étude, la méthode d'extraction au NaCl a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie et génétique moléculaire de l'université Constantine 3.

1.1. Méthode d'extraction d'ADN

Les étapes d'extraction de l'ADN leucocytaire se résument en cinq étapes :

- hémolyse du sang et préparation du culot leucocytaire,
- lyse des leucocytes, digestion du complexe nucléoprotéique et libération de l'ADN,
- extraction et purification de l'ADN,
- précipitation de l'ADN,
- solubilisation de l'ADN purifié.

Le protocole détaillé est fourni en (Annexe 5).

Méthodologie

1.2. Evaluation qualitative de l'ADN

La concentration en ADN de l'échantillon est estimée par spectrophotométrie.

En effet, les acides nucléiques présentent un pic d'absorption dans l'ultra violet, le maximum de cette absorption se situe à 260 nm, celle-ci peut être faussée en cas de contamination de l'ADN par les protéines et l'éthanol restants.

Une mesure de la densité optique (DO) ou de l'absorbance de l'ADN à 260 nm et à 280 nm est effectuée, car les protéines absorbent à 280 nm, le phénol à 270 nm et les bases puriques et pyrimidiques fortement dans l'ultraviolet à 260 nm.

Par le moyen du rapport de $R = DO\ 260\ \text{nm} / DO\ 280\ \text{nm}$, la pureté de l'ADN est déterminée en indiquant la contamination de l'ADN par les protéines ou par les ARN.

On considère que :

Si $1,6 < R < 2$: l'ADN est pur.

Si $R < 1,6$: l'ADN est contaminé par les protéines.

Si $R > 2$: l'AND est contaminé par des ARN.

La pureté de l'ADN est essentielle pour une action efficace des enzymes de restriction utilisées par la suite. Dans le cas où l'ADN est contaminé, ce dernier ne laisserait pas aboutir à un bon résultat dans les étapes suivantes de son analyse par PCR. Il est donc indispensable de procéder par la réextraction de la pelote de l'ADN afin d'obtenir la pureté souhaitée.

Les ADN purs sont conservés à + 4 °C jusqu'à utilisation.

1.3. Evaluation quantitative de l'ADN :

La densité optique à 260 nm permet de calculer la concentration de l'ADN sachant que :

$$1 \text{ unité de DO } 260 \text{ nm} = 50 \mu\text{g/ml d'ADN double brin}$$

Considérant que l'ADN est dilué à 1/100 (10 ml de l'ADN dilué dans 990 ml d'eau stérile), la concentration de l'ADN extrait ([ADN]) est déterminée par la formule suivante :

$$[\text{ADN}] \mu\text{g/ml} = \text{DO } 260 \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{facteur de dilution}$$

Méthodologie

2. Amplification par PCR

2.1. Principe

La réaction PCR permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

Pour avoir la réplication d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes.

- dénaturation de l'ADN pour obtenir des matrices simple brin. La température de la dénaturation est comprise entre 92°C et 95°C. A cette température, les liaisons hydrogènes se dissocient et les ADN double brins se séparent en ADN simple-brins (ADN monocaténares).
- hybridation des amorces spécifiques, qui s'effectue à une température de 50°C à 65°C. Cette température d'hybridation est un paramètre important pour la réussite de la PCR et doit être calculée en fonction du T_m (Température de fusion) des deux amorces. Cette diminution de la température permet aux liaisons hydrogènes de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider
- réalisation de la réaction de polymérisation du brin complémentaire à une température de 72°C. A cette température, la *Taq* polymérase se lie aux ADN monocaténares amorcés et catalyse la réplication en utilisant les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) présents dans le mélange réactionnel.

Tableau 3 : Les amorces utilisées et la taille du produit de PCR

Mutation	Séquence d'amorce	Taille du fragment amplifié en pb
G908R	Sens : 5' CAC TGA CAC TGT CTG TTG ACT C 3' Anti-sens : 5' AAG ACC TTC ATA AGT GGC CCC 3'	163

Méthodologie

2.2. Protocole de la PCR

Cette étape a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie moléculaire, faculté SNV de l'université des frères Mentouri, Constantine 1.

2.2.1. Préparation du milieu réactionnel (mix)

La préparation du mélange réactionnel de la PCR est effectuée avec des quantités précises pour chaque réactif.

Tableau 4 : Les composants du milieu réactionnel pour la PCR.

MIX	Vol (μ l)/tube de PCR
H ₂ O	15,1
MgCl ₂ à 1,5 final (25mM)	1,5
Tampon 10X	2,5
dNTP 2mM final	2,5
Amorce sens (100 ng/ μ l)	0,5
Amorce anti-sens (100 ng/ μ l)	0,5
<i>Taq</i> DNA 5U/ μ l	0,4

Pour chaque tube nous avons pris 24 μ l de mélange (mix) avec 1 μ l d'ADN.

2.2.2. Déroulement des cycles de la PCR

Le déroulement des cycles de la PCR a été réalisé par un thermocycleur (Ependorf) et les conditions d'amplification étaient comme suit :

Tableau 5 : La programmation du thermocycleur

Etapes	Température °C	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94°C	5min	1
Dénaturation	94°C	30s	30 cycles
Hybridation	61,8°C	30s	
Elongation	72°C	30s	
Elongation finale	72°C	7min	1

Méthodologie

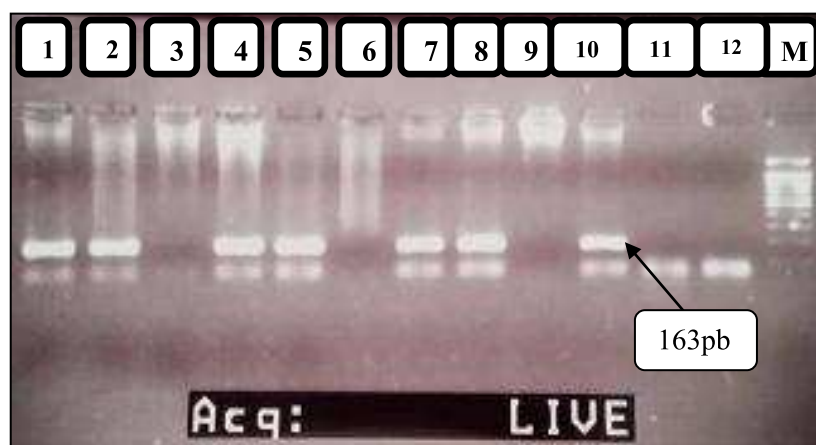
2.2.3. Contrôle des produits PCR

Le contrôle des produits PCR s'effectue par électrophorèse. C'est une technique de séparation des macromolécules, elle se base sur le principe de la séparation et l'identification des fragments d'ADN amplifiés selon leurs charges et leurs tailles. Les ADN sont des macromolécules polyanioniques uniformément chargées négativement, la charge relative de l'ADN étant constante. De ce fait, l'ADN peut migrer dans un champ électrique de la cathode (-) vers l'anode (+) dans un tampon de migration du TBE (Tris Borate EDTA).

L'électrophorèse est assurée sur gel d'agarose à 2% (2g d'agarose+ 100 ml de TBE 1X) additionné à 10 µl de BET (Bromure d'éthidium). Ce dernier est un réactif intercalaire se fixant entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice et qui rend chaque ADN fluorescent par exposition aux UV pour visualiser les bandes résultantes.

Le gel est ensuite coulé sur plaque d'une cuve horizontale. Dans chaque puits du gel du côté cathode (-), nous avons déposé 10 µl de produit d'amplification + 3 µl BBP (Bleu de Bromophénol) permettant de suivre le front de migration. En réservant 2 puits, un pour le dépôt du marqueur de taille (pour le contrôle de taille des fragments amplifiés) et le deuxième pour le dépôt du blanc (témoin négatif). Ce dernier, sert à détecter si une éventuelle contamination de l'ADN est survenue au cours de la PCR. Ensuite, le système est soumis à une migration sous un courant de 100 volts pendant 30 min.

Après la migration, la visualisation des bandes est effectuée sous rayons UV et révélée par une coloration au BET. Le gel est photographiable et permet de visualiser les fragments amplifiés sous forme de bandes fluorescentes de même taille.



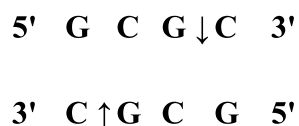
Photographie 1: le profil électrophorétique de la PCR du polymorphisme G908R.

Méthodologie

3. La digestion enzymatique des produits de PCR

3.1. Préparation de la digestion

Les produits de la PCR sont soumis à une digestion enzymatique par HhaI clivant les molécules à des endroits précis appelés sites de restriction.



Dans chaque tube qui contient le produit de PCR, nous avons ajouté 1µl de l'enzyme de restriction HhaI, suivie d'une incubation pendant une nuit dans une étuve à 37°C. L'action de clivage de cette enzyme est détectée par une variation du nombre et de la longueur des fragments de restriction obtenus après digestion enzymatique (Tableau 6).

Tableau 6 : Génotypage du polymorphisme G908R

Mutation	Enzyme de restriction	Génotypage	Longueur du fragment en pb
G908R	HhaI(Promega, 1,000u)	Homozygote sauvage (GG)	163
		Hétérozygote (GC)	27, 136 et 163
		Homozygote muté (CC)	27 et 136

3.2. Electrophorèse des produits de la digestion

Les fragments d'ADN digérés par l'enzyme de restriction sont séparés par électrophorèse effectuées dans les mêmes conditions que celles des produits PCR. Cependant, la petite taille de ces fragments, a nécessité la préparation d'un gel d'agarose plus résolutif à 3 % (3g d'agarose avec 100ml de TBE à 1X). La migration s'effectue sous un courant de 100 volts pendant 45min. Les fragments résultants sont ensuite visualisés sous UV.

4. Analyses statistiques

Dans notre étude, les calculs statistiques de tous les échantillons obtenus ainsi que tous les paramètres considérés ont été obtenu par le logiciel Epi info version 6.0.

Méthodologie

❖ Calcul de l'odds ratio (OR)

Pour calculer l'OR, nous avons établi un tableau de contingence présenté sous forme de tableau croisé 2×2. Le statut malade/non malade des sujets est présenté en colonne et le caractère présence ou absence du facteur présumé de risque de maladie en ligne

Tableau 7 : Tableau de contingence

	Patients	Contrôle(Témoins)	Total
Exposé	A	B	A+B
Non exposé	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	A+B+C+D

La cote d'être exposé (Exposure Odds) pour les malades = A/C et pour les témoins = B/D

Afin de mesurer l'association entre un facteur et une pathologie, l'OR est calculé comme suit :

$$\text{OR} = A * D / B * C$$

L'OR représente une mesure d'association épidémiologique entre un facteur et une maladie, en particulier lorsque la maladie est rare parmi la population (prévalence < 5%).

Si :

OR = 1 : pas d'association entre l'exposition et la maladie.

OR < 1 : association négative.

OR > 1 : association positive.

❖ Le choix de la p- value

Le calcul de la p-value nécessite la détermination d'un intervalle de confiance indiquant le degré de certitude des résultats d'une recherche, cet intervalle fournit une fourchette de valeurs, situées de part et d'autre de l'estimation, où l'on peut être sûr à 95% de trouver la valeur réelle. Le seuil critique est donc évalué à 0,05 (risque α). Si la valeur de p-value calculée a posteriori est inférieure à ce seuil, la différence entre les paramètres est déclarée significative.

Résultats et discussion

1. Caractéristiques principales des patients

1.1. Age

Notre échantillon est subdivisé selon des tranches d'âge de 10 ans (Tableau 8).

Tableau 8 : Répartition des patients par tranche d'âge

Age	Effectif (n)	Pourcentage %
10-19	1	6,66 %
20-29	3	20 %
30-39	5	33,33 %
40-49	4	26,66 %
50-59	1	6,66 %
60-69	1	6,66 %
Total	15	100 %

L'âge moyen de la population malade est de $39,82 \pm 7,62$ avec des extrêmes de 16 à 64 ans. Ceci confirme que la MC touche les individus les plus jeunes. Une fréquence élevée ou bien un pic a été observée entre 30 et 39 ans, soit 33,33%, suivie d'une fréquence de 26,66% entre 40 et 49 ans, de 20% entre 20 et 29 ans et de 6,66% pour les autres tranches d'âge.

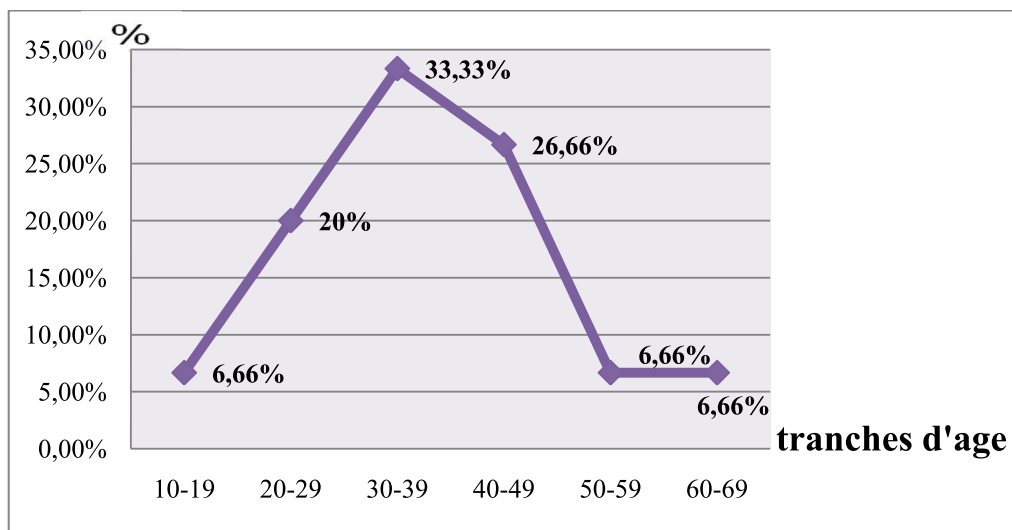


Figure 5 : Répartition des patients par tranche d'âge.

Résultats et discussion

Ces résultats se rapprochent de ceux réalisés dans notre pays par Hammada et al en 2011, dont l'âge médian au moment du diagnostic initial était de 36 avec un pic d'incidence de 21,21 dans la tranche d'âge 35-39 ans (Hammada *et al.*, 2011).

Alors qu'une étude algérienne récente montre que l'âge moyen est de $33,05 \pm 12,10$ avec un pic de 43.70 % dans la tranche d'âge 20-29 ans (Daoui *et al.*, 2016).

1.2. Sex-ratio

Dans notre série, nous notons une prédominance féminine avec 9 femmes et 6 hommes soit un sex-ratio de 1,5 (9 F/6 H).

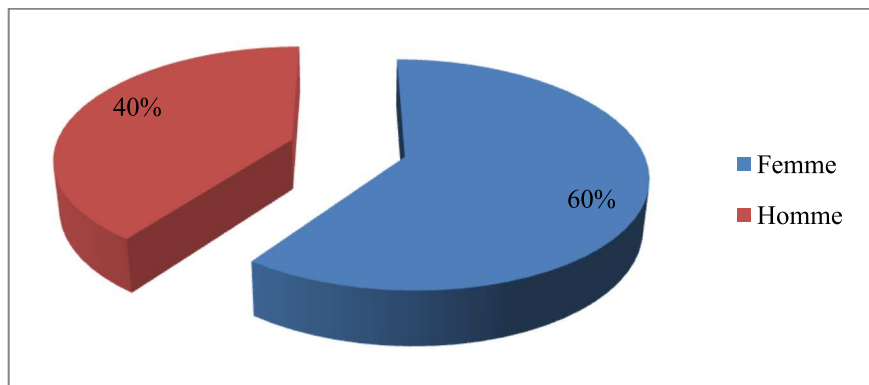


Figure 6 : Répartition des patients selon le sexe.

Les études réalisées précédemment en Algérie confirment cette prédominance féminine (Hammada *et al.*, 2011; Daoui *et al.*, 2016), ainsi que les pays à moyenne et à haute incidence, la MC touche surtout les femmes, la prédominance féminine concerne spécifiquement les femmes très jeunes, ce qui a suggéré l'intervention des facteurs hormonaux endogènes ou exogènes dans l'expression de la MC (Shivananda *et al.*, 1996; Loftus, 2004) .

Cependant, les hommes étaient plus touchés que les femmes dans des zones à faible incidence, tel que le Japon et la Chine. Ceci est expliqué en partie par l'importance du tabagisme dans ces pays (Leong *et al.*, 2003).

1.3. Age et sex-ratio

Dans notre cohorte, le pic pour la MC se situe dans différentes tranches d'âge dans les deux sexes (Figure 7).

Résultats et discussion

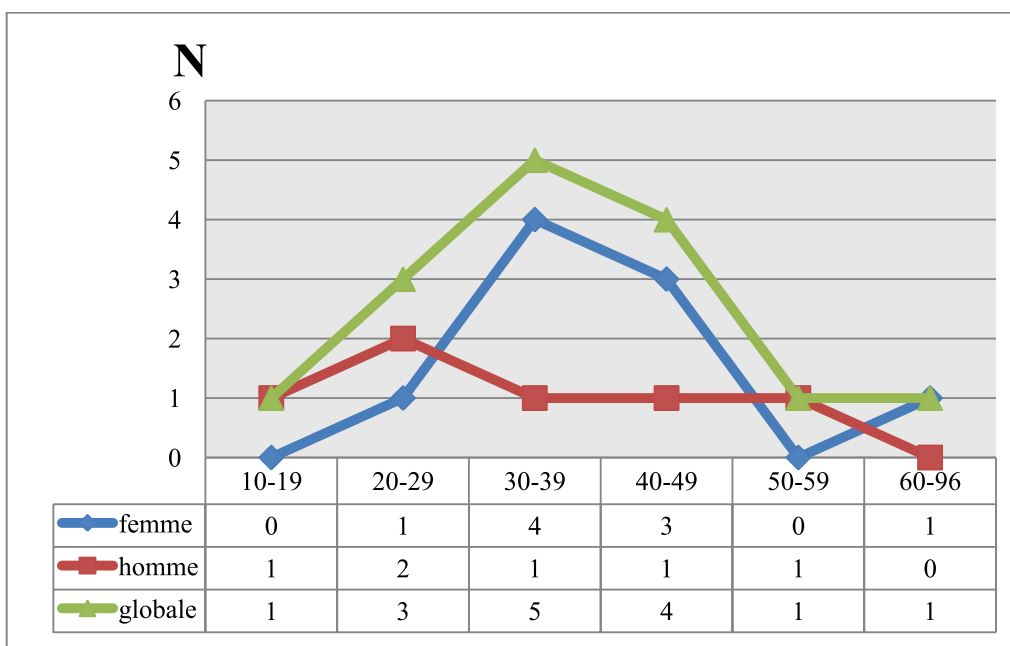


Figure 7 : Répartition selon l'âge et le sexe.

Cependant le pic de fréquence rejoint le pic global de la maladie pour les femmes (30 et 39 ans), alors qu'il prédomine à des tranches d'âge beaucoup plus jeunes pour les hommes (20 et 29 ans), cette différence peut être expliquée par le facteur de tabagisme.

Selon une étude qui a été réalisée sur une population algéroise, une très légère prédominance féminine avec un sex-ratio de 1,05 et un pic d'âge entre 29-30 ans a été observée, alors que le pic d'âge était entre 20-29 ans chez les hommes (Balamane *et al.*, 2013).

Une autre étude concernant la population de Constantine a révélé que le pic le plus élevé de l'incidence annuelle moyenne de la MC était de 13,23/100.000 habitants par an chez les femmes entre 35-39 ans, et de 8,92/100.000 habitants par an chez les hommes pour la tranche d'âge de 50-54 ans. Sachant que le sex-ratio est 1,11. Hammada *et al* (2011),

1.4. Statut tabagique

Le tabac joue un rôle important dans le développement de la MC. Il n'est pas la cause de cette maladie, mais c'est un facteur favorisant. Dans notre série, 20% de patients sont des fumeurs, ce faible pourcentage peut être expliqué par l'absence de tabagisme dans la population féminine prédominante (Figure 8).

Résultats et discussion

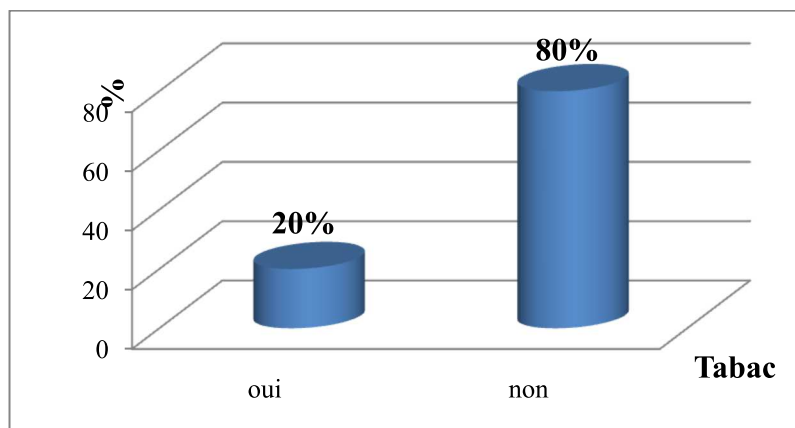


Figure 8 : Répartition des malades selon le statut tabagique.

En Algérie, le même résultat a été signalé par Bounab *et al* (2011), par contre l'étude de Daoui *et al* (2016) montre un pourcentage de patients fumeurs plus élevé (40,78%). Cette observation a été signalée en Grèce, France et en Allemagne (Tableau 9).

Tableau 9 : Fréquences des patients fumeurs dans certaines études.

Auteur	Pays	Année	Fréquence des fumeurs
Gazouli et al	Grèce	2010	51,1
Bounab et al	Algérie	2011	24,8
Azzam et al	Arabie Saoudite	2012	15,2
Elazzaoui et al	Maroc	2012	13,7
Niess et al	Allemagne	2012	50,81
Jung et al	France	2012	54,7
Daoui et al	Algérie	2016	40,78

1.5. Aspects cliniques : résultats

1.5.1. Manifestations générales

Une altération de l'état général accompagne souvent les poussées de la MC, l'amaigrissement est noté chez tous les patients (100%), la fièvre est présente chez 13,33%, l'anémie est exprimée chez sept patients avec 46,67%. Le retard de croissance est un symptôme qui est spécifique pour les patients ayant les premiers signes de la MC à un âge

Résultats et discussion

précoce (Vernier *et al.*, 2005). Dans notre série, nous n'avons trouvé aucun cas avec un retard de croissance. Alors que l'étude qui a été réalisée par Daoui *et al* montre la présence de quatre jeunes patients avec un retard staturo-pondéral (3,88%).

1.5.2. Manifestations digestives

Les douleurs abdominales sont les principaux signes digestifs qui représentent 86,67% de nos patients, accompagnés de diarrhées chroniques avec rectorragies de 20% ou sans rectorragie de 26,67%. La même observation a été remarquée par Daoui *et al* (2016), dont les douleurs abdominales représentent 75,73% des cas et les diarrhées chroniques 40,77% avec ou sans rectorragies. Selon Azzam *et al* (2012), les douleurs abdominales sont observées chez 86,4%, et les diarrhées chez 75% des patients.

1.5.3. Manifestations extra-digestives

Dans notre cohorte les manifestations extra-digestives sont estimées à 26,67% :

- les manifestations oculaires sont les plus fréquentes avec 13,33%,
 - les manifestations articulaires et cutanées représentent le même pourcentage avec 6,67%,
- Dans la littérature, le pourcentage de manifestations extra-digestives rejoint les observations de De Diego *et al* (2006) et Daoui *et al* (2016).

En pratique clinique, les patients atteints de la MC peuvent présenter simultanément 2 à 3 signes extradiigestifs. Dans notre échantillon, aucun cas n'a été trouvé, alors que 20,93% des patients avec ces signes extradiigestifs ont été observés chez Daoui *et al* (2016).

1.6. Classification phénotypique

1.6.1. Age de diagnostic

La maladie peut se déclencher à n'importe quel âge, elle est rarement diagnostiquée durant la petite enfance et nous la trouvons plus fréquemment chez les adolescents et les jeunes adultes entre 20 et 30 ans.

L'âge de début de la maladie varie selon la population d'étude. Dans notre échantillon la majorité des patients ont les premiers symptômes de la MC dans la période d'âge qui est inférieure à 40 ans (A1) avec un pourcentage de 73,33%, alors que (A2) représente 26,67% (Figure 9).

Résultats et discussion

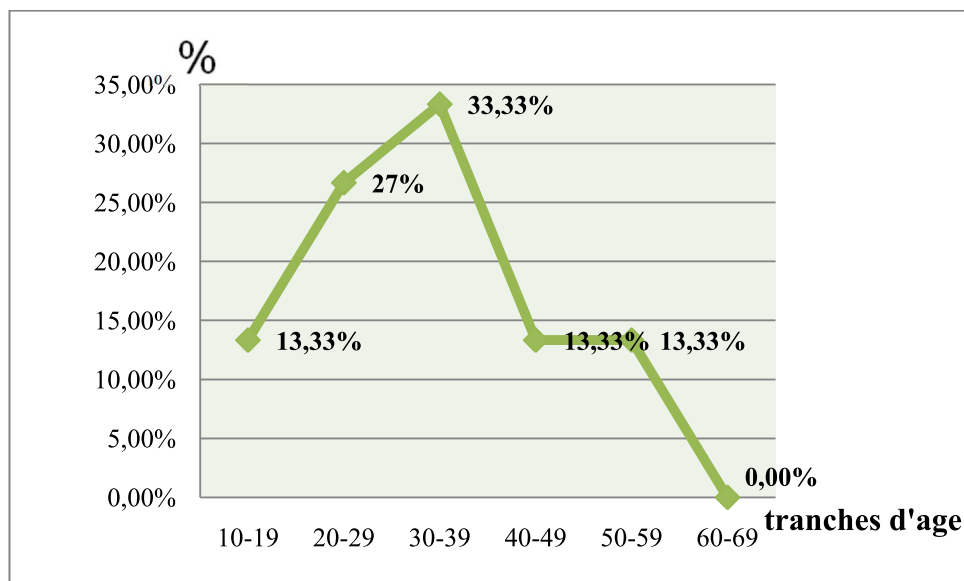


Figure 9 : Répartition des patients selon l'âge de diagnostic.

En comparant nos données avec celles de la littérature, l'âge de début de la maladie varie selon la population d'étude. Dans les pays méditerranéens, la majorité des patients ont les premiers symptômes de la MC dans la période d'âge qui est inférieure à 40 ans (De Diego *et al.*, 2006 ; Meddour *et al.*, 2014). Cependant, dans la population chinoise, la classe A2 est prédominante (Long *et al.*, 2014).

Selon Daoui *et al* (2016) l'âge de diagnostic était inférieur à 40 ans.

1.6.2. Localisation anatomique de la maladie

La MC peut toucher l'ensemble du tube digestif, de la bouche jusqu'à l'anus, même si le colon et l'iléon terminal sont les régions préférentielles de la maladie.

La distribution anatomique des lésions varie selon l'ancienneté et l'évolution de la maladie.

Chez nos patients, la maladie est localisée le plus souvent au niveau de la partie iléo-colique (L3) avec un pourcentage de 66,67%, l'iléon (L1) est atteint chez 13,33% et le colon (L2) chez 6,67% des cas, cependant le type (L4) est inexistant (Figure 10).

Résultats et discussion

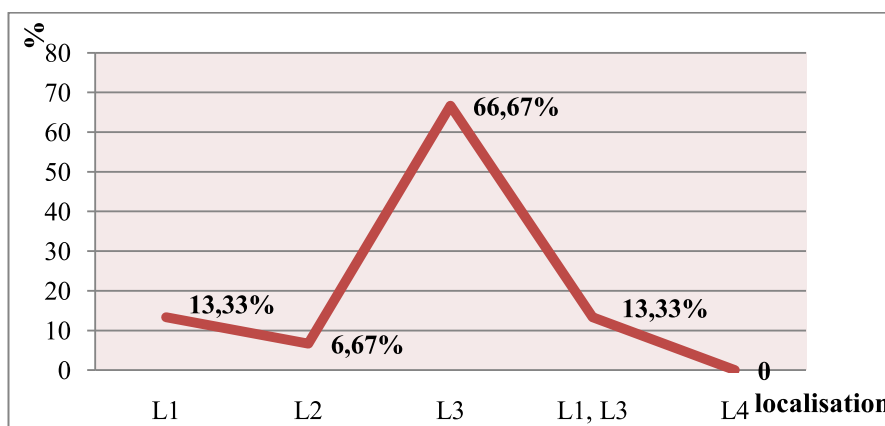


Figure 10 : Répartition des patients selon la localisation de la maladie.

Nos résultats sont de façon globale concordant avec les données de la littérature (Tableau 10).

Tableau 10 : Localisation de la maladie selon certaines séries.

Auteur	Pays	Année	Localisation iléo-colique (L3)	iléale pure (L1)	Colique (L2)
Leong et al	Chine	2004	44%	4%	30%
Bounab	Algerie	2011	51,40%	29,60%	19%
Serghini et al	Tunisie	2016	37%	28%	35%
Daoui et al	Algerie	2016	41,47%	32,10%	23,30%

❖ **Les Lésions ano-périnéales (LAP)**, sont définies par la présence des fissures et/ou ulcérations, fistules anales et périnéales. Elles peuvent présenter des aggravations vers l'abcès ou la sténose.

Les LAP sont très caractéristiques de la MC et d'une grande valeur diagnostic. Dans notre série, elles représentent un pourcentage de 20% et sont associées aux localisations iléo-coliques. Alors que, leur incidence varie selon les études entre 10 à 80 %. Elles peuvent être présentes à n'importe quel stade de la maladie et dans un tiers des cas elles précèdent même les atteintes intestinales (Cosnes *et al.*, 2011).

Résultats et discussion

Même si la prévalence globale de la MC intestinale est très variable d'un pays à l'autre, il ne semble pas y avoir de différence significative ni géographique ni en fonction de l'âge et du sexe concernant les lésions ano-périnéales (LAP) (Staumont, 2010).

1.6.3. Intensité de la maladie

La MC est classée selon les critères de sévérité et de type des lésions, cette classification est établie par le médecin qui se base sur les résultats cliniques, endoscopiques et histologiques. Ainsi la forme sténosante (B2) est la plus fréquente (46,67%) chez nos patients, suivie de la forme sténosante, pénétrante (B2, B3) et la forme inflammatoire (B1) (13,33%). Notre échantillon est caractérisé par l'absence totale des patients avec la forme pénétrante, (Figure 11).

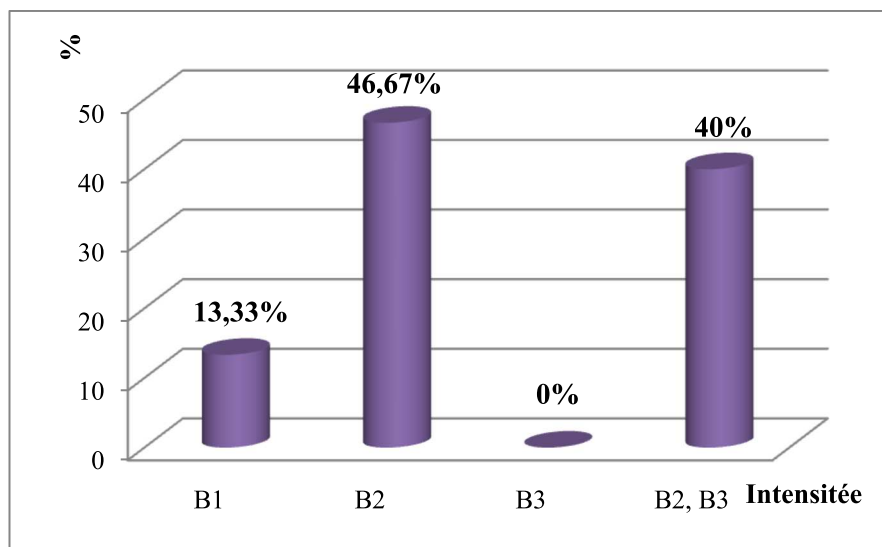


Figure 11 : Répartition de l'intensité de la maladie.

L'intensité de la maladie est variable en fonction de plusieurs paramètres qui sont simultanés avec la période des crises ou en dehors des poussés inflammatoires. La prédominance de la forme sténosante est observée dans les études qui ont été réalisées en Australie (Bhullar *et al.*, 2014) et en Algérie (Meddour *et al.*, 2014; Daoui *et al.*, 2016).

Alors que dans les pays voisins, en particulier au Maroc et en Tunisie, la proportion de la forme B2 (sténosante) est relativement faible (Elazzaoui, 2012; Serghini *et al.*, 2016).

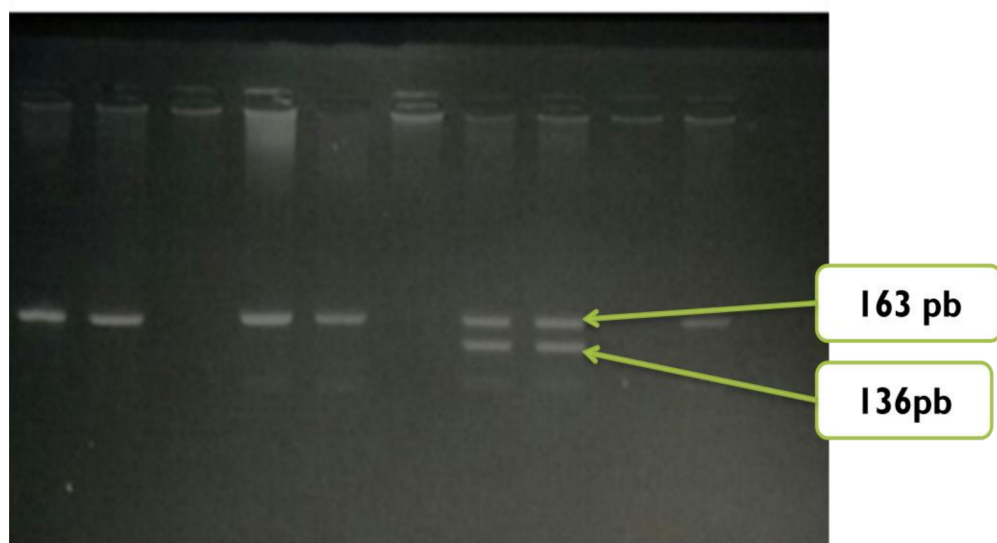
Résultats et discussion

2. Polymorphisme G908R

2.1. Fréquences alléliques et génotypiques

Après la digestion enzymatique et la migration des fragments obtenus, la lecture montre l'apparition de deux génotypes différents :

- L'homozygote sauvage « GG » est caractérisé par l'apparition d'une seule bande de 163 pb.
- L'hétérozygote « GC » est déterminé par l'apparition de deux bandes de taille différente, 163 pb et 136 pb (Photographie 2).



Photographie 2 : Profil de digestion des fragments du polymorphisme G908R.

Dans notre série, les profils électrophorétiques ne montrent que deux génotypes, l'homozygote normal « GG » (66,67% chez les patients et 96% chez les témoins) et l'hétérozygote « GC » (33,33% des patients et 4% des témoins), alors que le génotype homozygote muté « CC » est absent dans les deux populations malade et témoin.

La fréquence de l'allèle muté est plus importante chez les patients (16,67%) que chez les témoins (2%) (Tableau 11).

Résultats et discussion

Tableau 11 : Représentation des fréquences alléliques de polymorphisme G908R du gène CARD15 chez la population témoins et malades.

Génotype	Patients		témoins		OR	p-value
	N	%	N	%		
GG	8	66,67	24	96	-	-
GC	4	33,33	1	4	12 (0,98-329,67)	0,014
CC	0	0	0	0	-	-
Total	12	100	25	100	-	-
Allèle G	20	83,33	49	98	-	-
Allèle C	4	16,67	1	2	9,90 (0,93-245,49)	0,018

Statistiquement, il y'a une association significative entre le polymorphisme G908R et la MC. Une concordance avec nos résultats a été signalée par Meddour *et al* (2014) sur une population algéroise. Par contre la plupart des études qui ont été réalisées en Tunisie et en Espagne ont montrée une association négative, ainsi que l'étude faite par Daoui *et al* (2016) (Tableau 12).

Tableau 12 : Comparaison des fréquences des allèles mineurs du G908R chez certaines Populations.

Auteurs	Année	Pays	nombre de patients	Fréquences	significations
Zouiten-Mekki et al	2005	Tunisie	130	5	-
De Diego et al	2006	Espagne	183	3	-
Meddour et al	2014	Algérie	204	3	+
Daoui et al	2016	Algérie	103	5,85	-

Résultats et discussion

2.2. Corrélation phénotype/génotype

Pour comprendre la corrélation entre la présence de la mutation G908R du gène *CARD15/NOD2* et les caractéristiques phénotypiques de la MC, nous avons calculé l'OR et p-value dans chaque comparaison phénotypique spécifique de notre cohorte.

Les résultats statistiques montrent une absence d'association entre le G908R et la localisation, l'intensité et le tabagisme, par contre l'affection articulaire des signes extra-digestifs était significative.

Nous suggérons que nos résultats ne sont pas concluants car la taille de la population étudiée est minime.

2.2.1. Corrélation du polymorphisme G908R et la localisation de la MC

Tableau 13 : Corrélation du polymorphisme G908R et la localisation de la MC.

Localisation De la MC	Effectifs (n)			Pourcentage%			OR	P-value
	GC	GG	CC	GC	GG	CC		
L1	1/1	0/1	0	100	0	0	/	0,13
L2	0/1	1/1	0	0	100	0	0	0,46
L3	3/9	6/9	0	33,33	66,67	0	1 (0,03-42,59)	1
L1, L3	0/1	1/1	0	0	100	0	0	0,46

Des résultats importants concernant la relation entre la présence de la mutation et la localisation de la maladie avaient été publiés. Dans une étude britannique, la présence de ces mutations était significativement corrélée à la localisation iléale de la maladie (Ahmad *et al.*, 2002), ce résultat avait été appuyé par d'autres études dont principalement une méta analyse publiée par Economou (Economou *et al.*, 2004).

D'autres études avaient observé que la mutation *CARD15/NOD2* était inversement corrélée à la localisation de la maladie (Naser *et al.*, 2012; Salkic *et al.*, 2015).

Résultats et discussion

2.2.2. Corrélation du polymorphisme G908R et l'intensité de la MC

Tableau 14 : Corrélation du polymorphisme G908R et l'intensité de la MC.

Intensité De la MC	Effectifs (n)			Pourcentage%			OR	P-value
	GC	GG	CC	GC	GG	CC		
B1	1/2	1/2	0	50	50	0	2,33 (0-137,25)	0,58
B2	2/7	5/7	0	28,57	71,43	0	0,60 (0,03-11.8)	0,67
B2, B3	1/3	2/3	0	33,33	66,67	0	1 (0-29,91)	1

Ce résultat a été également signalée au Brésil et en Arabie Saoudite (Baptista *et al.*, 2008; Azzam *et al.*, 2012).

Bien que les résultats ne soient pas encore très exhaustifs, la méta-analyse d'Economou *et al* (2004), avait rapportée l'existence d'une association entre la mutation et la forme sténosante de la maladie.

2.2.3. Corrélation du polymorphisme G908R et le tabac

Tableau 15 : Corrélation du polymorphisme G908R et le tabac.

Tabac	Effectifs (n)			Pourcentage%			OR	P-value
	GC	GG	CC	GC	GG	CC		
Oui	1/2	1/2	0	50	50	0	2,33 (0-137,25)	0,58
Non	3/10	7/10	0	30	70	0		

Dans la population algérienne, saoudienne et française, aucune association significative entre la mutation et le tabac n'est rapportée (Azzam *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2012; Meddour *et al.*, 2014).

Résultats et discussion

2.2.4. Corrélation du polymorphisme G908R et les signes extra-digestifs

Tableau 16 : Corrélation du polymorphisme G908R et les signes extra-digestifs.

Signes extra-digestifs	Effectifs (n)			Pourcentage%			OR	P-value
	GC	GG	CC	GC	GG	CC		
Articulaires	1/1	0/1	0	100	0	0	/	0,045
Oculaires	0/2	2/2	0	0	100	0	0	0,248
Cutanées	0/1	1/1	0	0	100	0	0	0,576
Total	1/4	3/4	0	25	75	0	0,56 (0,01-13 ,86)	0,66

Nos résultats ne concordent pas avec ceux des études qui ont été réalisées par Azzam *et al* (2012) et Jung *et al* (2012), mais cette constatation ne peut être prise en considération vu l'effectif de notre cohorte.

Conclusion et perspectives

La MC est une affection inflammatoire chronique de cause inconnue qui peut atteindre tous les segments du tube digestif, elle n'a pas de cause unique identifiée et semble être multifactorielle (susceptibilité génétique, flore intestinale particulière, dysfonctionnement du système immunitaire). Les symptômes de cette maladie ont un impact important sur la qualité de vie des patients, son évolution est souvent grave et peut aboutir à un cancer du côlon.

Notre étude a permis de soulever quelques caractéristiques épidémiologiques et anatomo-cliniques de la MC chez 15 patients. Elle a révélée une prédominance féminine avec une diminution de la fréquence de tabagisme.

Les méthodes de génotypage ont amené une meilleure connaissance de l'architecture du génome humain, par des études de larges cohortes de malades atteints de la MC. Ceci a permis d'identifier plusieurs dizaines de gènes et de loci associés à cette maladie.

L'exploration génotypique du G908R chez 12 patients et 25 témoins montre une corrélation significative entre le polymorphisme G908R et l'apparition de la MC.

Il faut noter que le contexte génétique semble avoir une faible importance dans la physiopathologie de cette maladie dans notre situation, vue la fréquence diminuée de la mutation *CARD15/NOD2* et l'absence des antécédents familiaux.

Ainsi, il serait intéressant de pouvoir continuer ce travail en :

- élargissant notre cohorte de patients afin de pouvoir étudier des corrélations génotype/phénotype.
- étudiant les deux autres polymorphismes du gène *CARD15/NOD2* (1007fs et R702W).
- analysant l'interaction des différents variants génétiques entre eux et avec l'environnement.

Références bibliographiques

- Ahmad, T., Armuzzi, A., Bunce, M., Mulcahy-Hawes, K., Marshall, S.E., Orchard, T.R., Crawshaw, J., Large, O., de Silva, A., Cook, J.T., et al. (2002). The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 122, 854–866.
- Ando, A., Mitinori, S., Tetsuaki, H., and Masashi (1996). Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J. Cell Biol.* 133, 43–47.
- Azzam, N., Nounou, H., Alharbi, O., Aljebreen, A., and Shalaby, M. (2012). CARD15/NOD2, CD14 and toll-like 4 receptor gene polymorphisms in Saudi patients with Crohn's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 4268–4280.
- Balamane, A., Smail, N., and Benhabyles, A. (2013). Quelques données épidémiologiques de la maladie de Crohn à Alger (Auditorium de l'institut Pasteur d'Algérie Dely Ibrahim).
- Baptista, M.L., Amarante, H., Picheth, G., Sdepanian, V.L., Peterson, N., Babasukumar, U., Lima, H.C., and Kugathasan, S. (2008). CARD15 and IL23R influences Crohn's disease susceptibility but not disease phenotype in a Brazilian population. *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 674–679.
- Bernstein, C.N., and Shanahan, F. (2008). Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut* 57, 1185–1191.
- Bhullar, M., Macrae, F., Brown, G., Smith, M., and Sharpe, K. (2014). Prediction of Crohn's disease aggression through NOD2/CARD15 gene sequencing in an Australian cohort. *World J. Gastroenterol.* 20, 5008–5016.
- Binder, V. (1998). Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Basel Switz.* 16, 351–355.
- Bommas-Ebert, U., Teubner, P., and Voss, R. (2008). Cours d'anatomie (De Boeck Supérieur).
- Boudiaf, M., Soyer, P., Terem, C., Pelage, J., Kardache, M., Dufresne, A., and Rymer, R. (2000). Abdominal complications of Crohn's disease: CT features. *J. Radiol.* 81, 11–18.
- Boudiaf, M., Soyer, P., and Rymer, R. (2004). Examens morphologiques au cours des MICI. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 28, D46-51.
- Bouhnik, Y. (2005). [Diagnostic tools in inflammatory bowel diseases]. *Rev. Prat.* 55, 977–983.
- Bouladoux, N., Hand, T.W., Naik, S., and Belkaid, Y. (2013). Microbiota and T lymphocytes: the best enemies. *Med. Sci. MS* 29, 349–352.
- Bounab, N. (2011). Histoire naturelle de la maladie de Crohn.
- Bourgain, C. (2014). Genomics from bench to bedside: a change in perspective. *Med. Sci. MS* 30 *Spec No* 2, 14–17.

Références bibliographiques

- Bruns, T., Peter, J., Reuken, P.A., Grabe, D.H., Schuldes, S.R., Brenmoehl, J., Schölmerich, J., Wiest, R., and Stallmach, A. (2012). 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* 32, 223–230.
- Catala, M., Andre, J., Katsanis, G., and Poirier, J. (2008). Histologie: organes, systèmes et appareils. CHUPS Jussieu Frhistohistop2peau Html.
- Conti, C.B., Giunta, M., Gridavilla, D., Conte, D., and Fraquelli, M. (2017). Role of Bowel Ultrasound in the Diagnosis and Follow-up of Patients with Crohn's Disease. *Ultrasound Med. Biol.* 43, 725–734.
- Cooney, R., and Jewell, D. (2009). The genetic basis of inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Basel Switz.* 27, 428–442.
- Cortot, A., Pineton de Chambrun, G., Vernier-Massouille, G., Vigneron, B., and Gower Rousseau, C. (2009). Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : maladies génétiques ou de l'environnement? *Gastroentérologie Clin. Biol.* 33, 681–691.
- Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., and Cortot, A. (2011). Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140, 1785–1794.
- Crohn, B.B., Ginzburg, L., and Oppenheimer, G.D. (1952). Regional ileitis; a pathologic and clinical entity. *Am. J. Med.* 13, 583–590.
- Curran, M.E., Lau, K.F., Hampe, J., Schreiber, S., Bridger, S., Macpherson, A.J., Cardon, L.R., Sakul, H., Harris, T.J., Stokkers, P., et al. (1998). Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16. *Gastroenterology* 115, 1066–1071.
- Daoui, Z., Hammada, T., Benlahcen, B., Abadi, N., and Satta, D. (2016). CARD15 Gene Polymorphisms in Algerian Patients with Crohn's Disease: Genotype-Phenotype Correlation. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 36, 22–29.
- De Diego, C., Alcántara, M., Valle, J., Pérez-Grueso, M.J., Muñoz-Rosas, C., Carrobes, J.M., and Martínez-Castro, P. (2006). Frequency of CARD15 polymorphisms in patients with Crohn's disease from Toledo, Spain: genotype-phenotype correlation. *Genet. Test.* 10, 178–185.
- Dethlefsen, L., and Relman, D.A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 Suppl 1, 4554–4561.
- Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., et al. (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314, 1461–1463.

Références bibliographiques

- Economou, M., Trikalinos, T.A., Loizou, K.T., Tsianos, E.V., and Ioannidis, J.P.A. (2004). Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am. J. Gastroenterol.* *99*, 2393–2404.
- Elazzaoui, Z. (2012). Les aspects épidémiologiques des MICI dans une population marocaine (a propos de 300 cas).
- Elewaut, D., DiDonato, J.A., Kim, J.M., Truong, F., Eckmann, L., and Kagnoff, M.F. (1999). NF-kappa B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *163*, 1457–1466.
- Gazouli, M., Pachoula, I., Panayotou, I., Mantzaris, G., Chrousos, G., Anagnou, N.P., and Roma-Giannikou, E. (2010). NOD2/CARD15, ATG16L1 and IL23R gene polymorphisms and childhood-onset of Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* *16*, 1753–1758.
- Ghosh, S., and Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* *109 Suppl*, S81-96.
- Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* *16*, 225–260.
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J., and Sansonetti, P.J. (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* *278*, 8869–8872.
- Goodhand, J.R., Greig, F.I.S., Koodun, Y., McDermott, A., Wahed, M., Langmead, L., and Rampton, D.S. (2012). Do antidepressants influence the disease course in inflammatory bowel disease? A retrospective case-matched observational study. *Inflamm. Bowel Dis.* *18*, 1232–1239.
- Hammada, T., Lemdaoui, M.-C., Boutra, F., Zoughailech, D., and Asselah, H. (2011). Aspects épidémiologiques des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin dans une population algérienne. *J. Afr. Hépatogastroentérologie* *4*, 293–302.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* *132*, 344–362.
- Hooper, L.V., and Macpherson, A.J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 159–169.
- Hugot, J.-P. (2006). CARD15/NOD2 mutations in Crohn's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1072*, 9–18.
- Hugot, J.P., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Olson, J.M., Lee, J.C., Beaugerie, L., Naom, I., Dupas, J.L., Van Gossum, A., Orholm, M., et al. (1996). Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* *379*, 821–823.

Références bibliographiques

Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599–603.

Jaubert, D., Hollande, F., Jay, p, and Lagraverend, C. (2009). les cellules souches intestinales.

Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G.C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15064–15069.

Jung, C., Colombel, J.-F., Lemann, M., Beaugerie, L., Allez, M., Cosnes, J., Vernier-Massouille, G., Gornet, J.-M., Gendre, J.-P., Cezard, J.-P., et al. (2012). Genotype/phenotype analyses for 53 Crohn's disease associated genetic polymorphisms. *PloS One* 7, e52223.

Kaser, A., Lee, A.-H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E.E.S., Higgins, D.E., Schreiber, S., Glimcher, L.H., et al. (2008). XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 134, 743–756.

Kobayashi, K.S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nuñez, G., and Flavell, R.A. (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307, 731–734.

Kohler, H. (2011). Collège universitaire et hospitalier des histologistes, embryologistes, cytologistes et cytogénéticiens (CHEC).

Laass, M.W., Roggenbuck, D., and Conrad, K. (2014). Diagnosis and classification of Crohn's disease. *Autoimmun. Rev.* 13, 467–471.

Larsen, S., Bendtzen, K., and Nielsen, O.H. (2010). Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: epidemiology, diagnosis, and management. *Ann. Med.* 42, 97–114.

Lee, J., Mo, J.-H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A.N., Liu, Y.-T., Lee, H.-K., Shen, C., Cojocar, G., Shenouda, S., et al. (2006). Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 8, 1327–1336.

Leong, R.W.L., Armuzzi, A., Ahmad, T., Wong, M.L., Tse, P., Jewell, D.P., and Sung, J.J.Y. (2003). NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 17, 1465–1470.

Leong, R.W.L., Lau, J.Y., and Sung, J.J.Y. (2004). The epidemiology and phenotype of Crohn's disease in the Chinese population. *Inflamm. Bowel Dis.* 10, 646–651.

Lesage, S., Zouali, H., Cézard, J.-P., Colombel, J.-F., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C., Gassull, M., Binder, V., et al. (2002). CARD15/NOD2 mutational analysis

Références bibliographiques

and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 845–857.

Loftus, E.V. (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126, 1504–1517.

Lomas, D.J., and Graves, M.J. (1999). Small bowel MRI using water as a contrast medium. *Br. J. Radiol.* 72, 994–997.

Long, W.-Y., Chen, L., Zhang, C.-L., Nong, R.-M., Lin, M.-J., Zhan, L.-L., and Lv, X.-P. (2014). Association between NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in Chinese Zhuang patients. *World J. Gastroenterol.* 20, 4737–4744.

Magalhaes, J.G., Fritz, J.H., Le Bourhis, L., Sellge, G., Travassos, L.H., Selvanantham, T., Girardin, S.E., Gommerman, J.L., and Philpott, D.J. (2008). Nod2-dependent Th2 polarization of antigen-specific immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 7925–7935.

Marzouki, Z. (2014). Atresie de l'oesophage (A propos de 46 cas). SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE FES.

Matricon, J. (2010). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Med. Sci. MS* 26, 405–410.

Meddour, Y., Chaib, S., Bousseloub, A., Kaddache, N., Kecili, L., Gamar, L., Nakkemouche, M., Djidjik, R., Abbadi, M.C., Charron, D., et al. (2014). NOD2/CARD15 and IL23R genetic variability in 204 Algerian Crohn's disease. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 38, 499–504.

Medrano, L.M., Taxonera, C., González-Artacho, C., Pascual, V., Gómez-García, M., Barreiro-de Acosta, M., Pérez-Calle, J.L., Bermejo, F., López-Sanromán, A., Martín Arranz, D., et al. (2015). Response to Infliximab in Crohn's Disease: Genetic Analysis Supporting Expression Profile. *Mediators Inflamm.* 2015, 318207.

Naser, S.A., Arce, M., Khaja, A., Fernandez, M., Naser, N., Elwasila, S., and Thanigachalam, S. (2012). Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* 18, 412–424.

Nenci, A., Becker, C., Wullaert, A., Gareus, R., van Loo, G., Danese, S., Huth, M., Nikolaev, A., Neufert, C., Madison, B., et al. (2007). Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* 446, 557–561.

Niess, J.H., Klaus, J., Stephani, J., Pflüger, C., Degenkolb, N., Spaniol, U., Mayer, B., Lahr, G., and von Boyen, G.B.T. (2012). NOD2 polymorphism predicts response to treatment in Crohn's disease--first steps to a personalized therapy. *Dig. Dis. Sci.* 57, 879–886.

Pearson, D.C., May, G.R., Fick, G.H., and Sutherland, L.R. (1995). Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* 123, 132–142.

Références bibliographiques

Perez, L.-H., Butler, M., Creasey, T., Dzinck-Fox, J., Gounarides, J., Petit, S., Ropenga, A., Ryder, N., Smith, K., Smith, P., et al. (2010). Direct bacterial killing in vitro by recombinant Nod2 is compromised by Crohn's disease-associated mutations. *PloS One* 5, e10915.

Podolsky, D.K. (2002). Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 347, 417–429.

Rahmi, G. (2016). Exploration du tube digestif grâce à la vidéocapsule endoscopique par une dermatomyosite. *HEGEL - HEPato-Gastroenterol. Lib.* 350–355.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2, 361–367.

Rioux, J.D., Daly, M.J., Silverberg, M.S., Lindblad, K., Steinhart, H., Cohen, Z., Delmonte, T., Kocher, K., Miller, K., Guschwan, S., et al. (2001). Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat. Genet.* 29, 223–228.

Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Inazawa, J., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1997). Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. *Eur. J. Cell Biol.* 73, 222–231.

Salkic, N.N., Adler, G., Zawada, I., Alibegovic, E., Karakiewicz, B., Kozłowska-Wiechowska, A., Wasilewicz, M., Sulzyc-Bielicka, V., and Bielicki, D. (2015). NOD2/CARD15 mutations in Polish and Bosnian populations with and without Crohn's disease: prevalence and genotype-phenotype analysis. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 15, 67–72.

Sartor, R.B. (2006). Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 3, 390–407.

Satsangi, J., Silverberg, M.S., Vermeire, S., and Colombel, J. (2006). The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 55, 749–753.

Saussure, P., and Bouhnik, Y. (2007). Maladie de Crohn de l'adulte. - *EM-Gastroentérologie* 2, 1–18.

Schreiber, S., Rosenstiel, P., Albrecht, M., Hampe, J., and Krawczak, M. (2005). Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat. Rev. Genet.* 6, 376–388.

Serghini, M., Dabbebi, H., Matri, S., Kallel, L., Fekih, M., Boubaker, J., and Filali, A. (2016). Prévalence et facteurs prédictifs du déficit en vitamine D au cours de la maladie de Crohn : résultats d'une étude prospective tunisienne.

Shanahan, F., and Bernstein, C.N. (2009). The evolving epidemiology of inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 25, 301–305.

Références bibliographiques

- Shivananda, S., Lennard-Jones, J., Logan, R., Fear, N., Price, A., Carpenter, L., and van Blankenstein, M. (1996). Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 39, 690–697.
- Singly, B., and Camus, M. (2010). *Hépto-gastro-entérologie* (Paris: Paris : Maloine).
- Staumont, G. (2010). Prise en charge d'une localisation ano-périnéale (LAP) de Crohn à sa phase aiguë.
- Sun, L., Deng, L., Ea, C.-K., Xia, Z.-P., and Chen, Z.J. (2004). The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol. Cell* 14, 289–301.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Bengmark, S., Scholze, J., and Doerffel, Y. (2008). Bacterial biofilm suppression with antibiotics for ulcerative and indeterminate colitis: consequences of aggressive treatment. *Arch. Med. Res.* 39, 198–204.
- Tanabe, T., Chamaillard, M., Ogura, Y., Zhu, L., Qiu, S., Masumoto, J., Ghosh, P., Moran, A., Predergast, M.M., Tromp, G., et al. (2004). Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J.* 23, 1587–1597.
- Thome, M., Charton, J.E., Pelzer, C., and Hailfinger, S. (2010). Antigen receptor signaling to NF-kappaB via CARMA1, BCL10, and MALT1. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003004.
- Travassos, L.H., Carneiro, L.A.M., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.-G., Magalhães, J.G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., et al. (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* 11, 55–62.
- Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R., and Verma, I.M. (1996). Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 274, 787–789.
- Vernier, G., Cortot, A., Gower-Rousseau, C., Salomez, J.-L., and Colombel, J.-F. (2005). [Epidemiology and risk factors of inflammatory bowel diseases]. *Rev. Prat.* 55, 949–961.
- Villani, A.-C., Lemire, M., Fortin, G., Louis, E., Silverberg, M.S., Collette, C., Baba, N., Libioulle, C., Belaiche, J., Bitton, A., et al. (2009). Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet.* 41, 71–76.
- Wallace, K.L., Zheng, L.-B., Kanazawa, Y., and Shih, D.Q. (2014). Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* WJG 20, 6–21.
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schäffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., et al. (2004). NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53, 1658–1664.

Références bibliographiques

Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 6578–6583.

Yazdanyar, S., Weischer, M., and Nordestgaard, B.G. (2009). Genotyping for NOD2 genetic variants and crohn disease: a metaanalysis. *Clin. Chem.* *55*, 1950–1957.

Zhang, Y.-Z., and Li, Y.-Y. (2014). Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* *20*, 91–99.

Zouiten-Mekki, L., Zaouali, H., Boubaker, J., Karoui, S., Fekih, M., Matri, S., Hamzaoui, S., Filali, A., Chaabouni, H., and Hugot, J.P. (2005). CARD15/NOD2 in a Tunisian population with Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* *50*, 130–135.

Annexes

Annexe 1 : Complications extra-intestinales les plus communes des maladies chroniques intestinales aux Etats-Unis et en Europe (Larsen *et al.*, 2010).

Complication	Prévalence
Sclérite	18%
Uvéite	17%
Calculs biliaires (en particulier dans la MC)	13-34%
Arthrite inflammatoire	10-35%
Anémie	9-74%
Ostéoporose	2-20%

Annexes

Annexe 2 : Principaux critères distinguant MC et RCH (Podolsky, 2002)

	Rectocolite Hémorragique	Maladie de Crohn
Symptômes :		
Fièvre	+	++
Douleur abdominale	+/-	++
Diarrhée	+++	+
Sang dans les selles	+++	+
Perte de poids	+	++
Lésions péri-anales	-	+
Masse abdominale	-	++
Troubles de croissance chez les enfants	+/-	++
Localisation :		
Côlon	Exclusivement	1/3 des patients
Iléon	Jamais	1/3 des patients
Complications :		
Sténoses	-	++
Fistules	-	+
Cancer	++	+
Endoscopie :		
Lésions friables	+++	+
Lésions aphtoïdes	-	++
Aspect en pavé	-	++
Pseudopolypes	++	+
Radiologie :		
Distribution des lésions	Continue	Discontinue
Ulcérations	Superficielles	Profondes avec atteinte de la sous-muqueuse
Fissures	absentes	++
Présence d'anticorps :		
pANCA	70% des patients	+/-
ASCA	+/-	➤ 50% des patients

Annexes

Annexe 3 : le formulaire de consentement de participation à un projet de recherche.

Fiche de consentement du patient

République Algérienne Démocratique et populaire

Centre Hospitalier Universitaire de Constantine

Service d'Hépto-gastro-entérologie

Fiche de consentement du patient

Dans le cadre de : Etude moléculaire du gène CARD15/NOD2 chez des sujets atteints de la maladie de crohn

Je soussigné(e) :

Nom :

Prénom :

Déclare avoir pris connaissance des informations explicatives concernant cette étude j'accepte le prélèvement sous les conditions décrites en gardant tous mes droits stipulés par la loi d'éthique et de déontologie.

J'accepte ce type de recherche

Je m'oppose à ce type de recherche.

En cas de réponse affirmative, je souhaite que les résultats puissent m'être communiqués

Oui

Non

Signature du patient

Signature du chercheur

Signature du médecin

Annexes

Annexe 4 : le questionnaire

Fiche de renseignements

Numéro du service :.....

Service :.....

Médecin traitant :.....

Données relatives au patient

Nom :.....

Prénom :.....

Sexe : Féminin Masculin

Age :.....ans

Etat civil : Marié : Célibataire

Poids :.....Kg

Taille :.....

Tabac : Oui Non

Adresse :.....

Origine :.....

N° Tél :.....

Examens cliniques

1- Classification de Vienna :

- Age de diagnostic : A1 : <40 ans
- A2 : ≥40 ans

- Localisation : L1 : iléale
- L2 : colon

Annexes

L3 : iléo colique

L4 : en amont du tiers distal de l'iléon

- Intensité : B1 : non sténosante, non pénétrante
- B2 : sténosante
- B3 : pénétrante

2- Signes digestifs :

- Douleurs abdominales
- Diarrhée aigue : avec rectorragie sans rectorragie
- Signes ano-périnéaux

3- Sines généraux :

- Amaigrissement
- Fièvre
- Anémie
- Retard de croissance

4- Signes extra-digestifs :

- Articulaires
- Cutanées
- Oculaires
- Autres.....

Examens paracliniques

1- Biologiques :

- NFS =
- CRP =.....
- Ferritinémie =
- Créatinémie =
- Albumémie =.....
- Vitamine B12 =
- Folates sériques =.....
- Coproculture =.....

2- Endoscopiques :

.....
.....

3- Histologiques :

.....
.....

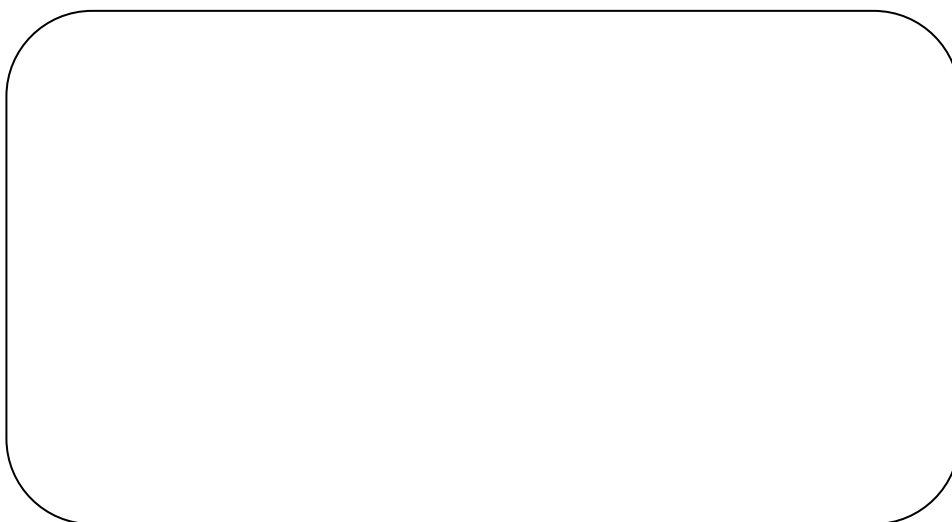
4- Radiologiques :

.....
.....

Annexes

Terrain génétique

- Issu d'un mariage consanguin : Oui Non
- Antécédents familiaux : Oui
 Non



L'arbre généalogique

Observations :

Le...../...../201.....
.....
.....
.....
.....
.....

Annexes

Annexes 5 : Méthode d'extraction au NaCl

1. Hémolyse du sang et préparation du culot leucocytaire

Le sang fraîchement recueilli dans les tubes EDTA est vigoureusement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les globules rouges.

La lyse est réalisée à +4°C durant 10 à 20 min. Ensuite, le lysat est centrifugé pendant 10 mn à 3900 tours/min. Une fois que le surnageant est éliminé, après deux lavages, on obtient un culot blanc, constitué essentiellement de leucocytes. Les étapes se sont déroulées comme suit :

1er lavage :

- mettre les 10 ml de sang dans un tube Falcon de 50 ml et compléter le volume à 50 ml avec du Tris EDTA (TE) 20 : 5
- laisser 10 min au congélateur à -18°C,
- centrifuger 10 min à 3900 tours/min,
- éliminer le surnageant en le versant prudemment dans un récipient sans décoller le culot leucocytaire contenu au fond de la paroi du tube.

2 ème lavage :

- ajouter au culot le TE 20 : 5 (compléter à 25 ml),
- laisser 10 min au congélateur à -18°C,
- centrifuger dans les mêmes conditions comme précédemment,
- verser délicatement le surnageant et garder le culot leucocytaire formé.

2. Lyse des leucocytes, digestion du complexe nucléoprotéique et libération de l'ADN

Pour la libération de l'ADN, la dissolution des membranes des leucocytes et la digestion des protéines associées à cet ADN se déroulent comme suit :

- transvaser le culot de leucocytes dans un tube Falcon de 15 ml,
- ajouter 3 ml de tampon de lyse (NaCl 400mM, EDTA 2mM, Tris 10mM, pH 8,2) en dilacérant le culot avec une pastille stérile,
- ajouter 200 µl du détergent anionique SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) à 10% pour la lyse des leucocytes, l'inhibition des nucléases, la dénaturation des protéines et l'activation de la protéinase K,
- ajouter 100 µl de protéinase K à 10 mg/ml dans le but de digérer toutes les protéines notamment les nucléoprotéines pour libérer l'ADN nucléaire,

Annexes

- mettre les tubes sous agitation (roue) à 37°C pendant une nuit car la protéinase K (10mg/ml) effectue son travail pendant 3 à 18h à 37°C.
- le lendemain, mettre les tubes dans le congélateur à -18°C afin de refroidir leurs contenus pendant 10 min.

3. Extraction et purification de l'ADN : méthode utilisant le NaCl

Dans le but d'éliminer les protéines par précipitation sélectives, le lysat cellulaire doit être traité par une solution saline comme suit :

- ajouter 1 ml de NaCl 4M,
- agiter vigoureusement à la main,
- laisser 5 min dans le congélateur à -18°C pour accélérer la précipitation des protéines,
- centrifuger 15 min à 2500 tours/min.

3.1 Précipitation de l'ADN

La précipitation est réalisée par de l'éthanol absolu à froid conservé à -80°C et à haute concentration (2.5 le volume de l'échantillon) qui, après une légère agitation, pompe l'eau entourant la molécule d'ADN pour la rendre moins soluble ; sans eau, la molécule d'ADN peut précipiter par formation d'une pelote, visible à l'œil nu sous forme d'une méduse (filaments). Le précipité est ensuite lavé et redissout dans le tampon TE 10 :1 (2 fois le volume de l'échantillon).

- récupérer la pelote par enroulement sur une pipette Pasteur,
- laver la pelote d'ADN 2 fois dans l'éthanol à 70% pour éliminer les sels,
- récupérer délicatement la pelote dans des tubes Eppendorf qui doivent rester ouverts durant environ 1h pour le séchage de l'ADN (par évaporation de l'éthanol).
- réhydrater l'ADN dans une solution de TE ou de l'eau bidistillée, puis conserver à -20°C.

3.2 Solubilisation de l'ADN purifié

La solubilisation est une des propriétés de l'ADN. Ce dernier, devient un sel d'acide en milieu aqueux et est ainsi soluble, pour cela, on procède comme suit :

- ajouter entre 300 à 1000µl d'eau distillée selon la grosseur de la pelote d'ADN et la concentration souhaitée,
- laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C, puis à +4°C jusqu'à dissolution complète pendant 1 à 3 jours.

RÉSUMÉ

La maladie de Crohn (MC) est une maladie chronique qui affecte le tube digestif, elle appartient aux maladies inflammatoires chroniques cryptogénétiques de l'intestin (MICI) qui sont des affections multifactorielles, résultants de la combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. Elle se déclare généralement chez les jeunes adultes. Sa prévalence a augmenté au cours de ces 20 dernières années.

L'objectif de notre travail était d'effectuer une analyse moléculaire du gène *CARD15/NOD2*, en étudiant le polymorphisme G908R et de rechercher la relation entre les caractéristiques phénotypiques de la maladie et la présence de cette mutation.

Méthodes : Notre étude, portant sur 15 patients atteints de la MC recrutés au niveau du service d'Hépatogastro-entérologie au Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Benbadis de Constantine, et 25 témoins, colligés sur une période de 3 mois. Le génotypage de polymorphisme G908R du gène *CARD15/NOD2* est déterminé par la technique de PCR/RFLP.

Résultats : L'âge moyen de nos patients est de $39,82 \pm 7,62$ ans avec des extrêmes allant de 16 à 64 ans et un pic de fréquence entre 30 et 39 ans. Le sexe ratio F/H était de 1,5.

La localisation iléo-colique est la plus fréquente (66,67%). La maladie est sténosante chez 46,67%, suivie par la forme sténosante pénétrante (40%) et la forme inflammatoire (13,33%).

Dans notre étude, le polymorphisme est représenté avec une fréquence génotypique de 33,33%. La fréquence de l'allèle muté est plus importante chez les patients (16,67%) par rapport aux témoins (2%).

Dans notre cohorte, une association significative entre le G908R et l'apparition de la MC a été trouvée, ainsi qu'une corrélation positive avec les signes extra digestifs (articulaires).

Conclusion : L'étude génétique avait révélé une association significative entre le polymorphisme G908R du gène *CARD15/NOD2* et la MC. Le contexte génétique semble avoir une faible importance dans la physiopathologie de cette maladie dans notre situation, vu la fréquence de la mutation *NOD2/CARD15* et l'absence des antécédents familiaux.

Mots clés : Maladie de Crohn, *CARD15/NOD2*, G908R, Génotype-phénotype, PCR/RFLP.

ABSTRACT

Crohn's disease (CD) is a chronic disease that affects the digestive tract, it belongs to chronic cryptogenetic inflammatory bowel diseases (IBD), which are multifactorial disorders, resulting from the combination of genetic and environmental factors. It usually occurs in the young adult. Its prevalence has increased over the past 20 years.

The objective of our work was to carry out a molecular analysis of the *CARD15/NOD2* gene, by studying the G908R polymorphism and to investigate possible associations between *CARD15/NOD2* mutation and the phenotypic characteristics of the disease.

Methods: Our study, involved 15 patients with CD recruited at the Hepato-Gastroenterology department at the University Hospital (CHU) Benbadis Constantine, and 25 controls, collected over a period of 3 months. Genotype of G908R polymorphism of The *CARD15/NOD2* gene was studied by PCR -RFLP technique.

Results: The average age of our patients is $39,82 \pm 7,62$ with extremes going from 16 to 64 years and a peak frequency between 30 and 39 years. The sex ratio F / H was 1,5.

The ileocecal localization is the most frequent in our serie, representing (66, 67%), the disease is stenosing in 46.67%, followed by stenosing penetrating form (40%) and inflammatory form (13, 33%).

In our study G908R polymorphism is represented with a genotypic frequency of 33.33%. The frequency of the mutated allele was higher in patients (16, 67%) compared to controls (2%).

In our cohort, a significant association between G908R and the onset of CD was found, as well as a positive correlation with extra-digestive (articular) signs.

Conclusion: The genetic study revealed a significant association between G908R polymorphism and CD. The genetic context seems to be of minor importance in the pathophysiology of this disease in our situation, given the frequency of the *CARD15/NOD2* mutation and the absence of family history.

Keywords: Crohn's Disease, *CARD15/NOD2*, G908R, genotype / phenotype, PCR / RFLP.

ملخص

مرض كرون هو مرض مزمن يصيب الجهاز الهضمي، يعتبر من أحد أنواع الأمراض الالتهابية للأمعاء، وهي متعددة العوامل، تنتج عن مزيج من العوامل الوراثية و البيئية حيث زاد انتشار هذا المرض خلال العقدين الماضيين.

الهدف من هذه الدراسة هو التحليل الجزيئي للمورثة *CARD15/NOD2* والبحث عن العلاقة بين الطفرة G908R و المرض.

الطرق: في دراستنا قمنا بجمع 15 مريضا بكرون من مصلحة الأمراض الكبدية و الجهاز الهضمي على مستوى المستشفى الجامعي ابن باديس بمدينة قسنطينة، و 25 شخصا شاهدا من أجل استخلاص مميزات هذا المرض. النتائج: متوسط العمر لعينة المرضى قدر ب $7,62 \pm 39,82$ سنة ما بين 16-64 مع ذروة الإصابة ما بين 30 و 39 عاما وبلغت نسبة الجنس (نساء-رجال) F/M 1,5.

تحصلنا على نسبة عالية من المصابين بمرض كرون في منطقة القولون اللفانفي 66,67%. المرض يتميز بالتهابات تتمثل في: التضيقى بنسبة 46,67%، تضيقى مخترق بنسبة 40%، واللاتضيقى لا مخترق بنسبة 13,33%. خلال دراستنا، الطفرة G908R موجودة بنسبة 33,33%. حيث أن نسبة تردد الأليل الطافر كانت أكبر عند المرضى (16,67%) مقارنة بالأصحاء (2%). لاحظنا في عينتنا المدروسة وجود علاقة بين الطفرة G908R للمورثة *CARD15/NOD2* و كرون، فضلا عن وجود علاقة إيجابية مرتبطة بالأعراض المفصلية

الملخص: الدراسة الوراثية أظهرت وجود علاقة بين الطفرة G908R ومرض كرون، حيث يبدو أن الخلفية الوراثية لها دور صغير في الفيزيولوجية المرضية لكرون، نظرا لوجود تردد للطفرة الوراثية *CARD15/NOD2* وانعدام المرض في التاريخ العائلي

مفاتيح الموضوع: مرض كرون ، G908R ، *CARD15/NOD2* ، التركيب الوراثي- النمط الظاهري، PCR/RFLP

Association du polymorphisme G908R du gène *CARD15/NOD2* et la maladie de Crohn

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique Moléculaire.

La maladie de Crohn (MC) est une maladie chronique qui affecte le tube digestif, elle appartient aux maladies inflammatoires chroniques cryptogénétiques de l'intestin (MICI) qui sont des affections multifactorielles, résultants de la combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. Elle se déclare généralement chez les jeunes adultes. Sa prévalence a augmenté au cours de ces 20 dernières années.

L'objectif de notre travail était d'effectuer une analyse moléculaire du gène *CARD15/NOD2*, en étudiant le polymorphisme G908R et de rechercher la relation entre les caractéristiques phénotypiques de la maladie et la présence de cette mutation.

Méthodes : Notre étude, portant sur 15 patients atteints de la MC recrutés au niveau du service d'Hépatogastro-entérologie au Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Benbadis de Constantine, et 25 témoins, colligés sur une période de 3 mois. Le génotypage de polymorphisme G908R du gène *CARD15/NOD2* est déterminé par la technique de PCR/RFLP.

Résultats : L'âge moyen de nos patients est de $39,82 \pm 7,62$ ans avec des extrêmes allant de 16 à 64 ans et un pic de fréquence entre 30 et 39 ans. Le sexe ratio F/H était de 1,5.

La localisation iléo-colique est la plus fréquente (66,67%). La maladie est sténosante chez 46,67%, suivie par la forme sténosante pénétrante (40%) et la forme inflammatoire (13,33%).

Dans notre étude, le polymorphisme est représenté avec une fréquence génotypique de 33,33%. La fréquence de l'allèle muté est plus importante chez les patients (16,67%) par rapport aux témoins (2%).

Dans notre cohorte, une association significative entre le G908R et l'apparition de la MC a été trouvée, ainsi qu'une corrélation positive avec les signes extra digestifs (articulaires).

Conclusion : L'étude génétique avait révélé une association significative entre le polymorphisme G908R du gène *CARD15/NOD2* et la MC. Le contexte génétique semble avoir une faible importance dans la physiopathologie de cette maladie dans notre situation, vue la fréquence de la mutation *NOD2/CARD15* et l'absence des antécédents familiaux.

Mots clefs : Maladie de Crohn, *CARD15/NOD2*, G908R, Génotype-phénotype, PCR/RFLP.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de biologie et génétique moléculaire

Jury d'évaluation :

Présidente du jury :	BOUCHAR-ZIADA Hadia	(MCB - UFM Constantine 1),
Rapporteur :	DAOUI Zineb	(MCB - Université Batna 2),
Examinatrice :	FERTOUL GHARZOULI Razika	(MCB - UFM Constantine1).

Date de soutenance : 03/07/2017