

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  
Département de Biologie Animale

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة  
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 Biologique  
Spécialité : Génétique

N° d'ordre :

N° de série :

Intitule :

# Implication du polymorphisme G2677T du gène ABCB1 dans la maladie du Crohn

Présenté et soutenu par : BARKAT Djouhaina  
HARIECHE Meriem

le : 15 /07/2021

Jury d'évaluation :

**Président :** Pr SATTA Dallila (Professeur, Université Constantine 1).

**Encadreur:** Dr SEDRATI-ZAAF Khadidja (MCB -Université Constantine 1).

**Examineur :** Dr DAOUI Zeineb (MCB Université de BATNA).

Année universitaire  
2020/2021

# *Remerciements*

## *AU TOUT PUISSANT ALLAH*

*Le grand et le Miséricordieux qui nous a aidé et muni de force et de patience pour réaliser ce mémoire.*

*Merci de nous avoir tenus en bonne santé pour la réalisation de ce mémoire. Merci de nous avoir donné la force et le courage d'entreprendre ce travail. Que gloire et louanges vous soient consacrées pour l'éternité.*

*Nos Sincères remerciements et notre profonde gratitude au Mm SEDRATI Khadidja les Mots ne suffiront pas et n'exprimeront pas tout ce que nous aimerions vous dire. Nous vous remercions de votre savoir-faire, votre soutien moral et gentillesse, votre disponibilité pendant toutes ces longues années et de vos connaissances que vous avez généreusement partagées avec nous.*

*Nous remercions sincèrement le président du jury et notre professeur Mm SATTI Dallila de nous avoir fait bénéficier de son expérience et surtout de sa rigueur scientifique. Ayant une large vision scientifique et qui nous a toujours donné les bons conseils. Nous sommes très reconnaissants. Merci pour nous faire l'honneur de présider la soutenance.*

*Nous exprimons ainsi nos remerciements à l'examineur Mm DAOUI Zineb d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous remercions l'ensemble de nos enseignants pour la qualité de l'enseignement tout au long de notre cursus universitaire.*

*Au terme cycle d'études, il nous paraît opportun de nous acquitter d'un devoir noble, celui de remercier tous ceux qui ont contribué par leur assistance tant morale que physique à notre cursus universitaire et à la réalisation de ce mémoire.*

# *Dédicace*

*\*Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers,*

*A MA TRÈS CHÈRE MAMA MEKAHLI MOUNTRA*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.*

*Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.*

*Tu as guetté mes pas, et tu m'as couvée de tendresse, tes prières et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.*

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.*

*A MON CHÈRE PAPA BARKAT NACER DINE*

*Tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es. Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.*

*A MA GRAND-MÈRE NAFFISA BERBECHÉ*

*Ce travail est le résultat de vos prières incessantes, de votre tendresse, et de votre amour.*

*A MES PETITES SŒURS KHADIDJA, RACHIDA*

*A tous les moments d'enfance passés avec vous, en gage de ma profonde estime pour l'aide que vous m'avez apporté. Vous m'avez soutenu, réconfortée et encouragée. Puissent nos liens fraternels se consolider et se pérenniser encore plus.*

*A LA MEMOIRE DE MES GRANDS PARENTS PATERNELS ET  
MATERNELS*

*J'aurais bien aimé que vous soyez parmi nous pour qu'ensemble nous  
partagions ce bonheur.*

*Puisse Allah vous réserve Sa clémence à Sa bien large miséricorde et  
vous accueillir en son vaste paradis auprès des prophètes et des saints.*

*A MON ONCLE MATERNEL SAMIR ET SON EPOUSE LYNDIA.*

*A MES TRES CHERS TANTES MATERNELS : MIMICHA, LATIFA,  
RABIAA, DALEL, HANEN, SIHAM, IKHLASS ET LEURS  
CONJOINTS.*

*A MES TANTES ET ONCLES PATERNELS A  
MES COUSINS ET COUSINES*

*Je vous aime beaucoup !*

*A MON MARI BENKHALIL BOUBAKEUR*

*Pour l'amour et l'affection qui nous unissent. Je ne saurais exprimer  
ma profonde reconnaissance pour le soutien continu dont tu as  
toujours fait preuve.*

*Tu m'as toujours encouragé, incité à faire de mon mieux, ton soutien  
m'a permis de réaliser le rêve tant attendu.*

*Je te dédie ce travail avec mes vœux de réussite, de prospérité et de  
bonheur.*

*Je prie Dieu le tout puissant de préserver notre attachement mutuel,  
et d'exaucer tous nos rêves*

*A TOUTES MA FAMILLE BARKAT ET MA BELLE-FAMILLE  
BENKHALIL.*

*A MON BINOME HARIECHE MERIEM.*

*Djouhaina*

*Je dédie ce modeste travail à*

*A MON TRÈS CHER PÈRE HARIËCHE ABD ELDJABBAR*

*Je ne sais pas par où commencer ! tout les mots du monde ne pourraient exprimer mon profond amour, respect et reconnaissance pour toi*

*Je veux te remercier pour absolument tout ! pour avoir été présent dans chaque étape de ma carrière, pour avoir respecté chacun de mes choix.*

*Tu m'as appris les valeurs nobles de la vie, le sens du travail et de la responsabilité.*

*Ce travail est le fruit des sacrifices que tu as consentis pour mon éducation.*

*J'espère avoir répondu aux espoirs que tu as fondés en moi !*

*Puisse dieu, le tout puissant, te combler de santé, de bonheur et te procurer longue vie.*

*Je t'aime l'homme de ma vie.*

*A MA TRÈS CHÈRE MÈRE BELATTAR MENOUBA*

*Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifices.*

*Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie.*

*Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance. J'espère ne jamais te décevoir, ni trahir ta confiance et tes sacrifices. Je t'aime mama*

*Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.*

*A MA TRÈS CHÈRE SŒUR ASMA*

*Tu as été à mes cotés pendant toutes les étapes de ma vie, je t'en suis très reconnaissante. Aucune dédicace ne peut exprimer la profondeur des sentiments fraternels et d'amour, d'attachement que j'éprouve à votre égard. Je vous dédie ce travail en témoignage de ma profonde affection en souvenirs de notre indéfectible union qui s'est tissée au fil*

*des jours. Puisse dieu te protéger, garder et renforcer notre fraternité.*

*A MES ANGES : ANES, MAYSSE ET NOURSSINE*

*Vous avez apportés beaucoup de bonheur à notre famille et surtout à moi, je vous aime.*

*A MA TRÈS CHÈRE SŒUR KHAWLA*

*Puisse Allah te protéger, garder et renforcer notre fraternité.*

*Je te souhaite tout le bonheur du monde. Je t'aime.*

*A MES FRÈRES D'AMOUR : NADIR, ISHAK ET WALID*

*Je ne saurai traduire sur du papier l'affection que j'ai pour vous, je n'oublierai jamais ces merveilleux moments passés ensemble.*

*J'implore Allah de vous réserver un avenir meilleur.*

*A MES BELLES SŒURS D'AMOUR : HANANE ET ASMA.*

*MES BEAUX FRÈRES : MALAK ET ISMAIL.*

*A TOUTE MA FAMILLE HARIÈCHE ET BELATTAR.*

*A TOUTES MES AMIES : en particulier BADAOUI CHAHINEZ. JE T'AIME.*

*A tout ce qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration De ce travail.*

*A MON BINOME BATKAT JOUHAINA.*

*MERJEM.*



# Tables des matières

## Liste des abréviations

## Liste des figures

## Liste des tableaux

## Introduction

### I. Maladie du Crohn :

1. Définition.....	04
2. Histoire de la maladie.....	05
3. Epidémiologie.....	07
4. Physiopathologie.....	09
5. Etiologie.....	11
5.1 Causes distales.....	12
5.1.1 Facteurs environnementaux exogène.....	12
5.1.2 Facteurs génétiques endogène .....	14
5.2 Causes proximales.....	15
5.3 Phénotype inflammatoire.....	16
6. Diagnostic.....	17
7. Classification de la MC .....	18
7.1 Classification de la MC en fonction de l'âge .....	18
7.2 Classification de la MC en fonction de la localisation .....	19
7.3 Classification de la MC en fonction de type .....	19
8. Stratégies thérapeutiques .....	20

### II. Le gène ABCB1

1. ATP binding cassette B1.....	22
2. Produits du gène.....	23
3. Polymorphismes du gène ABCB1.....	25
4. Effets du polymorphisme.....	27
5. Corrélation ABCB1 et maladie de crohn.....	28
6. Corrélation G2677T/A et maladie de crohn.....	29

## **Patients et méthodes**

1. Echantillonnage.....	31
2. Prélèvement sanguin.....	32
3. Matériel d'étude moléculaire.....	32
3.1 Extraction d'ADN.....	33
3.2 Estimation de l'ADN.....	34
3.3 Génotypage du polymorphisme.....	34
3.3.1 L'amplification par PCR.....	35
3.3.2 Un control des produits PCR par une électrophorèse sur gel d'agarose.....	37
3.3.3 La digestion des produits PCR.....	38
3.3.4 L'électrophorèse des produits de la digestion.....	38
3.4 Etude statistique analytique.....	39

## **Résultats**

1. Dans la population des témoins.....	40
2. Dans la population des patients.....	42
3. La comparaison entre les deux populations témoins et patients.....	43

## **Discussion**

## **Conclusion**

## **Références bibliographique**

## **Annexes**

## **Résumé**

## Liste des abréviations

**ABCB1** : *ATP Binding Cassette subfamily B Member.*

**ASCA** : *Anticorps Anti-Saccharomyces Cerevisiae.*

**ATP** : Adénosine Triphosphate.

**ARN<sub>m</sub>** : Acide Ribonucléique Messenger.

**CD<sub>(4/8)</sub>** : Cluster de différenciation.

**DTM** : domaine transmembranaire.

**GSTP1** : Glutathion S-transférase P.

**IL** : Interleukine.

**IRM** : Imagerie Par Résonance Magnétique.

**JAK2** : Janus Kinase 2.

**MICI** : Maladies Inflammatoires Chronique De L'Intestin.

**MII** : Maladies Inflammatoires De L'Intestin.

**MC** : Maladie De Crohn.

**MDR1** : *Multi Drug Resistance.*

**NOD2**: *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2.*

**NADPH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

**P-GP** : P-glycoprotéine.

**PCR** : *Polymerase Chain Reaction.*

**PP** : Plaques De Peyer.

**RCH**: Recto-Colite Hémorragique.

**RFLP**: *Restriction Fragment Length Polymorphism.*

**STAT3**: *Signal Transducer and Activator Of Transcription 3.*

**SNP**: *Single Nucleotide Polymorphisms.*

**TH**: *T Helper.*

**TGF-Beta**: *Transforming Growth Factor Beta.*

**T Reg** : *Lymphocytes T Regulator.*

**TNF-Alpha:** *Tumor Necrosis Factor Alpha.*

**XIAP:** *X-Linked Inhibitor Of Apoptosis.*

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Localisation de la maladie de Crohn.....	04
<b>Figure 2</b> : Evolution de l'incidence et de la prévalence combinée de la MC dans le monde entre 1960 et 1979 (COSNES., 2011).....	06
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique d'une paroi intestinale saine et pathologique.....	09
<b>Figure 4</b> : Schéma représentant la position du gène ABCB1 sur le chromosome 7.....	20
<b>Figure 5</b> : Structure en 2 dimensions du transporteur ABCB1.....	21
<b>Figure 6</b> : Schéma du gène ABCB1, de l'ARNm, et de la structure secondaire de la protéine..	22
<b>Figure 7</b> : Localisation des polymorphismes du gène ABCB1.....	25
<b>Figure 8</b> : Profil électrophorétique sur gel d'agarose des fragments issus par le clivage du <i>BanI</i> présentant le génotype de gène ABCB1.....	35
<b>Figure 9</b> : Photographie du gel après migration des fragments de digestion.....	36
<b>Figure 10</b> : Comparaison des fréquences génotypiques du polymorphisme G2677T du gène ABCB1 entre la population des témoins et la population des patients .....	41
<b>Figure 11</b> : Comparaison des fréquences alléliques du polymorphisme G2677T du gène ABCB1 entre les témoins et les patients .....	41

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Incidence, prévalences et rapports femme/homme de la maladie de Crohn de quelques pays et zones géographiques .....	07
<b>Tableau 2</b> : Les conditions de la réalisation de la PCR.....	34
<b>Tableau 3</b> : Préparation du milieu réactionnel de la PCR.....	34
<b>Tableau 4</b> : Résultats attendu des tailles obtenues de digestion enzymatique.....	36
<b>Tableau 5</b> : Tableau de contingence.....	37
<b>Tableau 6</b> : Fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme G2677T du gène ABCB1 dans la population témoins .....	39
<b>Tableau 7</b> : Fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme G2677T du gène ABCB1 dans la population patients .....	40
<b>Tableau 8</b> : Comparaison statistique entre les fréquences génotypiques et alléliques des populations témoins et patients.....	42

# *Introduction*





La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI), elle intéresse successivement, simultanément ou isolement un ou plusieurs segments du tube digestif, de la bouche à l'anus avec une prédilection pour l'iléon, le colon et l'anus. L'atteinte y est discontinue, hétérogène et transparietale (**Peyrin-Biroulet et al., 2010**)

Un gradient Nord/Sud existe pour la maladie de Crohn avec des régions à plus forte incidence qui sont le Royaume Uni, les Pays-Bas et la Somme alors que les régions qui ont les plus faibles incidences sont situées en Grèce. (**Molodecky et al., 2012**)

L'étiologie de la MC reste actuellement inconnue, mais de nombreux spécialistes s'accordent sur une origine multifactorielle faisant intervenir le système immunitaire, la génétique, l'environnement et la présence d'agents pathogènes, son incidence et sa prévalence sont en constante augmentation dans le monde. (**Bernstein et al., 2013**)

La MC qui est plus diagnostiquée chez le jeune adulte, est posée sur la base des symptômes et des résultats endoscopiques et radiologiques (**Baumgart et al., 2012**). Son traitement dépend de la gravité de la maladie, de la localisation de la maladie et du sous-type de maladie (**Rahimi et al., 2006**)

Le gène ABCB1 est localisé en position 7q21.1 (**Bodor et al., 2005**), hautement polymorphe, a été largement étudié pour les polymorphismes caractéristiques et environ 50 SNP pour ABCB1 ont été identifiés (**Hamidovic et al., 2010**). G2677T/A est un polymorphisme triallélique de l'exon 21 lié à la substitution d'une Guanine par une Thymine ou une Adénosine, Cela pourrait affecter la structure secondaire et la conformation de la protéine. Il est associé à des modifications de l'activité de la protéine in vivo (**Khosravi et al., 2019**). Ce polymorphisme été associé à la MC, mais son rôle dans la susceptibilité à la maladie reste incertain. (**Mijac et al., 2018**)

Dans le présent travail nous nous sommes intéressés à l'étude de l'un des paramètres moléculaires (le polymorphisme A2677T du gène ABCB1) en relation avec la survenue de la MC

Ce fut notre thème d'étude, dont les objectifs sont :

- Maitriser les outils et les techniques de bases de biologie moléculaire
- Étudier la distribution du polymorphisme A2677T du gène ABCB1 dans un échantillon de la population Algérienne.
- Déterminer une possible contribution du polymorphisme A2677T du gène ABCB1 dans la pathogénèse de la MC.

*Maladie de  
Crohn*

## 1. Définition :

Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) sont des maladies chroniques caractérisées par la présence de lésions inflammatoires pouvant toucher tout ou une partie de l'appareil digestif. La maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) sont les deux principales formes de MICI.

La MC résulterait de l'interaction de facteurs environnementaux, y compris le microbiote intestinal, avec le système immunitaire de l'hôte, chez des individus génétiquement prédisposés. (**Qin., 2012**). La preuve d'une contribution génétique dans la MC est largement établie. Il a été montré que le fait d'avoir un membre de la fratrie atteint augmentait de plus de 26 fois le risque de développer la maladie (**Thia et al., 2010**)

C'est une maladie inflammatoire chronique récurrente-rémittente affectant le tractus gastro-intestinal. Elle représente un trouble inflammatoire chronique caractérisé par des périodes de maladie active suivies d'une rémission ultérieure.

La maladie évolue par poussées d'intensité variable avec des rémissions parfois incomplètes et souvent spontanément régressives. La complication la plus courante de la MC est une occlusion intestinale causée par un épaissement de la paroi intestinale à cause du gonflement provoqué et des tissus cicatriciels.

En fonction du site de l'inflammation, trois grandes classes de MC, de prévalence différente, sont décrites (**Baumgart et al., 2012**) :

- L'iléite de Crohn uniquement localisée au niveau de l'iléon,
- La MC iléo-colique qui atteint à la fois l'iléon terminal et le gros intestin,
  - La colite de Crohn qui ne concerne que le gros intestin

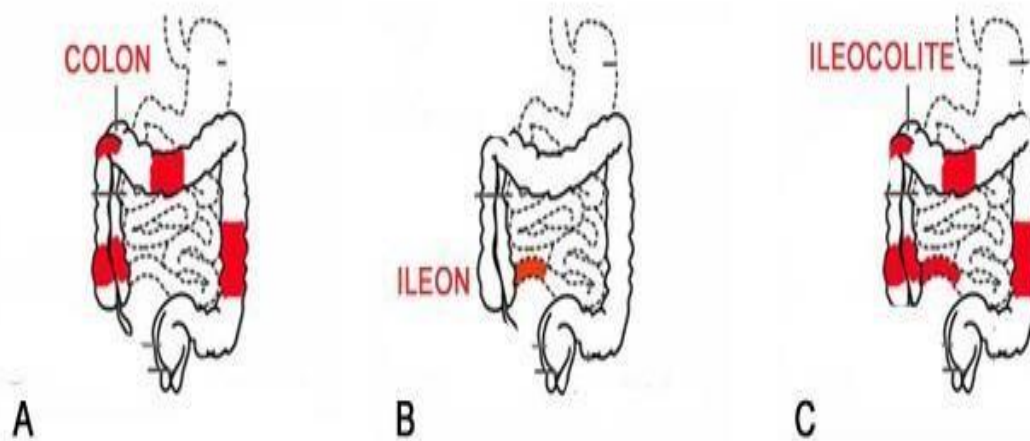


Figure 1 : localisation de la maladie de Crohn (WILLS et al., 1997).

les lésions anopérinéales (LAP) de la MC sont souvent méconnues ou négligées pendant l'évolution de la MC alors qu'elles peuvent toucher pratiquement un malade sur deux. En effet, les malades masquent des symptômes parfois considérés comme honteux (fistule ano-vaginale) ou humiliants (incontinence anale) d'une part et d'autre part les médecins recherchent peu ce type de manifestations qu'ils pensent s'intégrer dans la progression de la MC et pour lesquelles la prise en charge thérapeutique est souvent complexe. Pourtant, les progrès réalisés au cours des dix dernières années ont permis de mieux comprendre l'histoire naturelle de ces LAP, en permettant un accès facile et peu invasif aux fistules et abcès de la MC. (Ward *et al.*, 2013)

## 2. Histoire de la maladie

La maladie existait probablement bien avant le début du siècle car certaines descriptions anatomo-cliniques remontant à l'antiquité correspondent rétrospectivement avec le diagnostic (Wills *et al.* 1997)

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales sont très anciennes. La première explication de cette maladie a été exprimée par le médecin italien Giovanni Battista Morgagni (1682-1771) en 1769, alors qu'il a diagnostiqué cliniquement un jeune homme ayant une diarrhée chronique et maladie invalidante.

Depuis, la maladie s'est propagée et c'est en 1932, que le gastro-entérologue Burril Bernard Crohn (et deux de ses confrères Gordon D. Oppenheimer et Leon Ginzburg) l'ont fait

connaître. Bien que le docteur Crohn ne parvienne à déceler la cause de la maladie, il traitait des patients en provenance du monde entier dans l'errance thérapeutique.

Les premiers à parler de granulome non spécifique de l'intestin grêle furent Masschowitz et Wilensky en 1923 et 1927, mais la paternité de cette maladie revient en 1932 à Burril B. Crohn, médecin américain, qui a donné son nom à la maladie avec l'aide de ses collaborateurs. Il a rapporté 14 cas de malades opérés « d'iléite terminal » nommé à l'époque « entérite » ou « iléite régionale ». Plus tard, la maladie portera le nom de l'un de ces observateurs pour devenir ainsi la maladie de Crohn. **(Crohn *et al.*, 1932)**

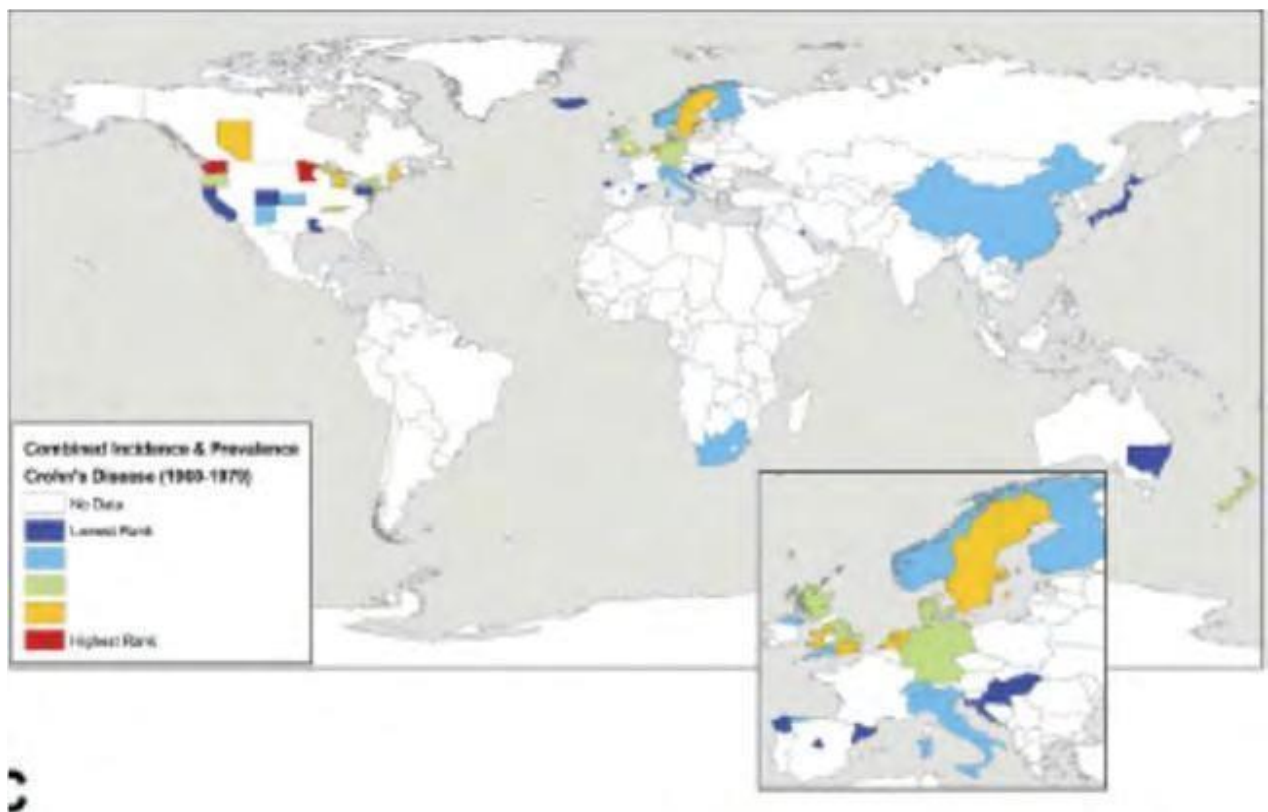
La description de ces lésions par B. Crohn était déjà assez complète, et peu de nouveautés sont intervenues dans ce domaine par la suite. Il s'est avéré que les mêmes anomalies tissulaires étaient retrouvées en d'autres endroits du tube digestif

En 1993 est signalé le cas d'une souris présentant une mutation du gène de l'interleukine et atteinte de troubles digestifs proches de la maladie de Crohn<sup>3</sup>, ce qui en fait le premier modèle animal de cette affection. **(Sadlack *et al.*, 1993)**

Des années après sa découverte et après la première parution publique des ses symptômes et effets, la maladie reste encore aujourd'hui mal comprise et difficile à cerner. **(Paulo., 2013)**

### 3. Epidémiologie

La prévalence de la MC a pu être mise en relation avec l'incidence de la maladie. Un gradient Nord-Sud est retrouvé avec des incidences plus élevées dans les états au Nord de l'Amérique du Nord et dans le centre du Canada. La maladie émergeant dans les pays en voie de développement peut suggérer que l'évolution épidémiologique est liée à l'occidentalisation du mode de vie et de l'industrialisation. La fréquence de la MC est en hausse dans de nombreuses régions, mais l'incidence s'est stabilisée dans de nombreuses régions de haute incidence. L'occidentalisation du style de vie impliquant des modifications des habitudes alimentaires, la consommation de cigarettes et d'autres modifications dans l'environnement liées à l'industrialisation pourraient expliquer cette augmentation (Satimai., 2017)



**Figure 2** : Evolution de l'incidence et de la prévalence combinée de la MC dans le monde entre 1960 et 1979 (COSNES., 2011).

**Tableau 1** : Incidence, prévalences et rapports femme/homme de la maladie de Crohn de quelques pays et zones géographiques

Zones (continent/pays)	Population concernée (%)	Incidence moyenne/10 <sup>5</sup> (année)	Prévalence/10 (année)	Ratio F/H	Références
<b>Europe</b>					
Royaume-Uni	0.18%	9.56 (2003-7)	181.8(2012)	1.8/1	(Steed <i>et al.</i> ,2010)
France	0.11%	6.7 (2006-7)	110 (2000)		(Chouraki <i>et al.</i> , 2011)
Croatie	0.47%	5.7 (2001)	46.4 (2001)		(Lakatos <i>et al.</i> 2006)
<b>Amérique du nord</b>					
Les Etats Unis	0.17%	5.64	241.3 (2008)		(Lfrus <i>et al.</i> , 2002)
Canada	0.37%	13.6	369 (2012)	1.3/1	(Fondation canadienne des MII., 2012)
<b>Asie et Océanie</b>					
Corée du sud		0.5 (198690) 1.34 (2001-05)			(Yang <i>et al.</i> , 2008)
Japon chine	0.021%  0.0035%	1.2 (1998)  1 (2006)	21.2 (2005)  3.5 (2006)	0.5/1  M>F	(Leong <i>et al.</i> , 2004)
<b>Afrique</b>					
Afrique du sud		2.6 (Blancs)  1.8 (Métis)  0.3 (Noirs)(1980-84)			(Gower-Rousseau , 2012)
Algérie (Alger)		1.49 (2003-6)	22.3 (2003-6)	1.064/1	5(Balamane <i>et al.</i> , 2013)
<b>Amérique du sud</b>					
Brésil	0.0056%	3.5	3.65 (2005)	F>M	(Victoria <i>et al.</i> , 2009)
Australie	0.137%	17.4 (2008)	137.3 (2005)	1.43/1	(Wilson <i>et al.</i> , 2010)



L'incidence et la prévalence de la MC sont en constante augmentation dans le monde surtout dans les pays développés. Elle affecte de façon prédominante, les sujets de race blanche, essentiellement, dans les pays les plus riches au monde ou industrialisés, à savoir l'Europe et les Etats Unis. L'incidence annuelle de la MC est estimée en Europe entre 0,3 et 12,7 cas pour 100000 habitants et la prévalence est de 0,6 à 322 cas pour 100000 habitants (**Shah et al., 2017**). La sex-ratio homme/femme pour la MC est de 0.8. Les jeunes de plus en plus touchés. (**Colombel et al., 2007**) elle est en augmentation dans les pays récemment industrialisés, comme la Croatie où l'incidence de la maladie à été multipliée par 10 entre 1980 et 2000. (**Loftus., 2004**)

En France, L'incidence annuelle de la maladie est voisine de 5.6 à 6 nouveaux cas /an/ 100000 habitants (d'après le registre EPIMAD). Sa prévalence est de 100/100000 habitants, elle a augmenté de 1988 à 1999 pour se stabiliser ensuite, sauf pour le taux des formes pédiatrique (moins de 20 ans) qui continue d'augmenter. En USA l'incidence est élevée : 6.19/100000 habitants et en Europe du Nord, elle est de 7.10/100000 habitants.

Elle est exceptionnelle en Amérique du Sud. (**Peyrin et al., 2010**) et En Afrique, elle varie de 0.3à 2.6/100000 habitants

Selon une étude en population Algéroise : la prévalence globale de la MC entre 2003-2006 est 22.35/100000 habitants et l'incidence annuelle est de 0.79 (1981-1985) ; 1.64 (1994-1998) ; 1.49 (2003-2006). (**Balamane., 2015**)

## 4. Physiopathologie

Le chorion normal contient de diverses cellules immunitaires et de cytokines sécrétées. Celles-ci comprennent les médiateurs anti-inflammatoires (TGF- $\beta$  et IL-10), ainsi que les médiateurs pro-inflammatoires qui limitent l'entrée excessive de microbiote intestinal et défendent l'intestin contre les agents pathogènes. La phagocytose par les macrophages, contribuent probablement à cette défense tout en minimisant les lésions tissulaires. Un équilibre homéostatique est toujours maintenu entre les cellules T-régulatrices (T-régs etc.) et les cellules

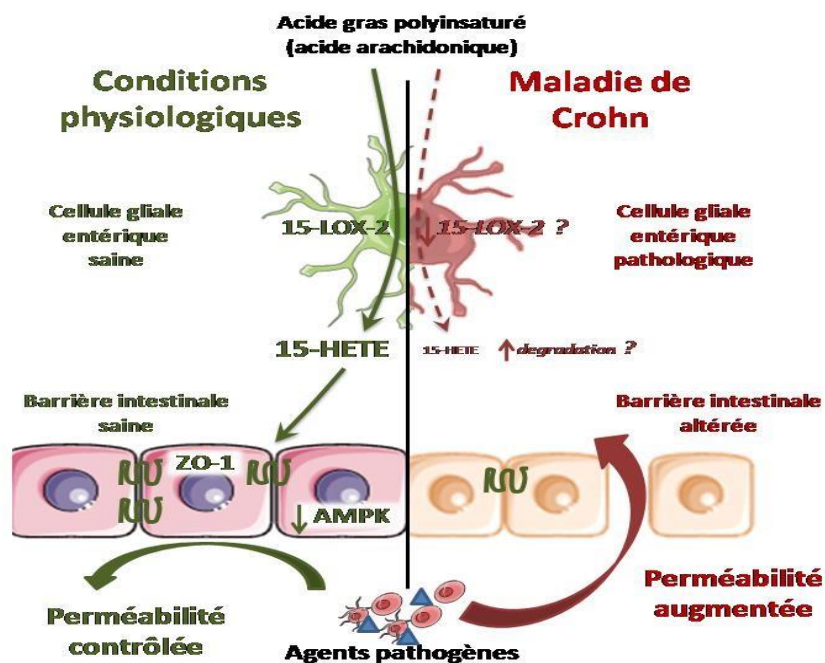
T effectrices (Th1, Th2 et Th17). (**Hakansson et al., 2011**)

La pathogenèse de la MC est basée sur l'inflammation des tissus, causée par une réponse immunitaire irrésistible contre les antigènes bactériens luminaux. Les cellules

immunitaires telles que les cellules T CD4, les cellules T CD8, les cellules B, les monocytes CD14 et les tueurs naturels sont impliquées dans ce processus. (Wallace *et al.*, 2014)

La pathogenèse est également entretenue par l'interaction de ces cellules avec des intégrines, des molécules d'adhésion et de multiples chimiokines, responsable pour le production de niveaux élevés de cytokines inflammatoires, représentant la cible des cellules immunitaires et non immunitaires et la promotion de l'inflammation muqueuse. (Simone *et al.*, 2015)

L'inflammation intestinale est initiée par une augmentation de l'exposition bactérienne, entraîne une perméabilité intestinale accrue qui entraîne une pénétration bactérienne dans le chorion. Les cellules innées répondent en sécrétant des taux accrus de TNF- $\alpha$  et d'autres cytokines pro-inflammatoires, y compris IL-12, IL-23 et les chimiokines (Abraham et Cho., 2009).



**Figure 3:** Représentation schématique d'une paroi intestinale saine et pathologique (Abraham et Cho., 2009).

La MC débute par une inflammation et des abcès cryptiques, qui se transforment en petits ulcères focaux aphtoïdes. Ces lésions muqueuses peuvent évoluer en ulcérations longitudinales et transversales profondes avec un œdème muqueux entre les ulcérations, donnant à l'intestin un aspect pavimenteux caractéristique. L'extension transmurale de l'inflammation entraîne un lymphœdème et un épaississement de la paroi intestinale et du

mésentère. La graisse mésentérique s'étend de façon caractéristique sur la séreuse intestinale. Les ganglions mésentériques augmentent souvent de volume. Une inflammation étendue peut entraîner une hypertrophie de la musculature muqueuse, une sclérose et la formation d'une sténose, pouvant aboutir à une occlusion intestinale. (**Fatahi et al., 2018**) La pathogénèse de la

MC n'est aujourd'hui pas entièrement élucidée. S'il paraît clair que les lésions inflammatoires sont secondaires à une dérégulation de l'immunité intestinale, les rôles de la génétique et des facteurs environnementaux et leurs intrications ne sont que partiellement connus à ce jour. La MC n'a pas de cause unique. On parle de maladie multifactorielle (**Jonathan ., 2014**)

La maladie évolue sous forme de poussées symptomatiques, entrecoupées d'intervalles asymptomatiques, les deux étant de durées variables. Cependant, chez 10 à 15% des patients, l'évolution est continue sans période de rémission (**Rowe et al., 2012**).

L'effet combiné des facteurs environnementaux et génétiques engendre une diminution de la sécrétion de mucus et de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales, résultant donc à la perte des mécanismes de contrôle de la flore intestinale, ce qui engendre la dysbiose tout en favorisant le développement des pathobiontes (**Manichanh et al., 2006**). Ces facteurs agissent également sur les jonctions intercellulaires au niveau de l'épithélium, provoquent l'augmentation de la perméabilité de cette dernière. Les bactéries pathogènes pourront ainsi être en contact direct et de manière prolongée avec l'épithélium intestinal, et envahir le chorion (**Kamada et al., 2013**). Cette perte de la fonction de barrière provoque une activation excessive du système immunitaire muqueux, puis l'apparition d'une inflammation chronique caractérisée par les lésions observées chez les patients de la MC (**Marcon et al., 2013**).

## **5. Etiologie**

L'étiologie de la MC est jusqu'à présent incomplètement comprise, il est toutefois globalement admis qu'elle s'agit d'une pathologie multifactorielle complexe, elle semble être la conséquence d'une anomalie de la réponse immunitaire de l'intestin vis-à-vis de composants de la flore intestinale chez des sujets génétiquement prédisposés, sous l'influence de facteurs environnementaux (**Kökten et al. 2016**).

## 5.1 Causes distales

Ce sont les causes les plus éloignées du mécanisme biologique aboutissant à l'inflammation muqueuse. Il faut comprendre que ces causes ne sont que probabilistes. Elles ne peuvent à elles seules entraîner la maladie selon un déterminisme précis. Elles contribuent seulement à définir un terrain à risque, autrement dit une propension pour une personne donnée à développer la maladie. (**Hugot *et al.*, 2015**).

### 5.1.1 Facteurs environnementaux exogènes

- **Le tabac**

Représente le facteur environnemental le plus important dans la MC, aussi bien au niveau de la prévalence que de la sévérité, il augmente le risque de développer une MC (50 à 60 % des patients sont fumeurs au moment du diagnostic) et il est déterminant pour la localisation des lésions, avec une prévalence plus élevée pour les iléites et plus faible pour les atteintes coliques par rapport aux non-fumeurs (**Cortot *et al.*, 2009**).

D'autre part, le tabac est un facteur aggravant de la MC. Il augmente la fréquence de survenue des poussées et du recours aux corticoïdes et aux immunosuppresseurs. Il est associé à des complications intestinales plus fréquentes et il expose à un taux de récurrences cliniques et chirurgicales significativement plus élevé (**Nos *et al.*, 2011**).

La consommation de tabac entraîne l'augmentation du taux de monoxyde de carbone sanguin et de la production muqueuse de radicaux libres. De par son action pro-coagulante, le monoxyde de carbone favorise la formation de micro-thromboses au niveau de la paroi intestinale qui aboutit, par conséquent, à une ischémie locale et donc à l'aggravation des lésions.

Les radicaux libres sont importants dans l'entretien de la réaction inflammatoire muqueuse. Leur action est normalement modulée par la présence d'antioxydants (vitamine C,  $\beta$ -carotène,  $\alpha$ -tocophérol...), déficitaires chez le fumeur

Le sevrage tabagique a donc un effet bénéfique indéniable sur la MC et ceci dès la première année. Il aurait un effet comparable à un traitement immunosuppresseur sur le risque de rechute (**Jantchou *et al.*, 2006**).

- **L'appendicectomie**

Certaines études ont montré que le risque de développer une MC était augmenté chez les personnes ayant subi une appendicectomie. Cependant, l'appendicectomie n'est pas considérée comme un facteur de risque à part entière mais plutôt comme la résultante des prémisses d'une MC sous-jacente. Un syndrome d'appendicite aiguë représente en réalité une forme d'entrée classique dans la maladie (**Bardou et al., 2007**).

- **Les habitudes alimentaires**

Le changement des habitudes alimentaires au cours du XXème siècle s'est fait parallèlement à l'augmentation des cas de MC. De plus, les antigènes alimentaires constituent, avec les antigènes bactériens, la plus grande source antigénique en contact avec la muqueuse digestive. Il est donc normal que de nombreuses études furent menées afin de mettre en évidence un rôle possible de l'alimentation dans l'étiologie de la MC. Les régimes pauvres en fibres, la surconsommation de sucres raffinés, de graisses, de protéines animales, de margarine, de fast-food, ou de microparticules (souillures, additifs, anti-agglomérants...) et la consommation d'eau du robinet ... ont tous été testés, mais aucun facteur n'a pu formellement être identifié (**Edouard et al., 2010**).

- **Le contact avec certains agents infectieux**

Parmi les agents infectieux directement mis en cause dans l'étiologie de la MC, on peut citer les virus de la rougeole et de la varicelle ainsi que *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* invasif et surtout *Mycobacterium avium paratuberculosis*. Cette dernière, présente dans le lait non-pasteurisé et l'eau potable, est mise en cause en raison de la présence de granules tuberculoïdes chez les bovins, à l'origine de la maladie de Jones présentant de nombreuses similitudes avec la MC. Là encore, aucune étude n'a pu prouver le rôle d'un agent infectieux mais la découverte du gène NOD2 dont la mutation entrainerait un défaut de clairance bactérienne relance cette hypothèse (**Bardou., 2007**).

- **L'amélioration au niveau d'hygiène**

L'amélioration des conditions d'hygiène, notamment pendant l'enfance, aboutissant à une diminution des contacts avec les germes, pourrait être à l'origine d'un défaut d'« éducation » du système immunitaire digestif. Cependant, cette thèse n'a toujours pas pu être confirmée (**Cosnes et al., 2006**).

- **Contraception orale**

La contraception orale augmenterait modérément (risque relatif = 1,46) le risque de développer une MC. En fonction de la durée d'exposition et du dosage, elle pourrait participer aux lésions en favorisant l'apparition de troubles thrombotiques vasculaires au niveau digestif.

A l'heure actuelle, le tabac est le seul facteur dont le rôle est unanimement reconnu, retrouvé de façon concordante et reproductible dans de nombreuses études. Cependant, l'hypothèse physiopathologique dont l'élément clé est la microflore intestinale donne du poids aux facteurs environnementaux que sont l'amélioration de l'hygiène et la modification des habitudes alimentaires. Ces modifications du mode de vie en rapport avec la modernisation de nos sociétés, susceptibles d'agir sur la flore microbienne intestinale, pourraient expliquer en partie l'influence de l'environnement sur la MC (**Klement *et al.*, 2004**).

- **Facteurs psychologiques :**

Nombreux sont les patients qui attribuent l'origine et l'évolution de leur MC à des troubles psychosomatiques (stress, problème sociaux, fatigue intellectuelle). Cependant, il est difficile d'établir un lien clair entre stress et MC dans la mesure où les études associant le déclenchement de la maladie et le stress sont rétrospectives, donc peu pertinentes et largement biaisées. En tout état de cause, les études vont majoritairement dans le sens d'une absence de corrélation entre grave événement de la vie (type décès d'un proche) et MC. (**Lerebours *et al.*, 2003 ; Goodhand *et al.*, 2012**).

### **5.1.2 Facteurs génétiques endogènes**

Crohn lui-même, en 1934, a rapporté la première forme familiale de MC. Les études ultérieures ont confirmé que la prédisposition aux MICI était en partie génétique, ce qui explique la présence d'agrégations familiales de ces maladies et la concordance entre jumeaux monozygotes. L'identification de gènes de susceptibilité aux MICI a commencé par l'identification de NOD2 dans la MC. NOD2 code pour un récepteur de produits de dégradation ou de renouvellement de la paroi bactérienne. Les mutations de NOD2 sont bien identifiées et elles restent, à ce jour, les facteurs de risque les plus forts et les plus spécifiques de la MC, expliquant que la recherche sur ce gène soit très active (**Hugot *et al.*, 2001**).

Connue de longue date comme une affection à composante héréditaire, plus commune chez certains groupes ethniques, la MC possède un élément génétique. Bien que les

chercheurs reconnaissent que les marqueurs génétiques sont utiles pour déterminer qui risque d'être susceptible à MC, il est aussi reconnu que des éléments déclencheurs environnementaux ou d'autres sortes d'agents jouent un rôle dans l'activation des gènes avant que la maladie se développe.

Une étude publiée dans la revue *Nature Genetics* en 2007 identifie plusieurs régions génétiques différentes liées à la MC. Elles semblent toutes être liées à la fonction de réponse immunitaire du corps (**Rioux et al., 2007**).

Aujourd'hui, le nombre de gènes impliqués dans la prédisposition génétique aux MICI est supérieur à 160. Ils sont pour la plupart partagés par la MC et la RCH (**Frank et al., 2010**). Il ne sera en fait jamais possible de dresser une liste exhaustive des variations génétiques associées à la MC (**Kimberley et al., 2017**).

La plupart des équipes recherchent actuellement non pas des variations génétiques anonymes et fréquentes mais plutôt des variations génétiques rares, présentes chez seulement quelques malades, mais associées à des effets biologiques forts comme c'est le cas pour les maladies mendéliennes classiques. Quelques résultats encourageants ont été obtenus chez l'enfant avec des mutations des gènes de l'IL 10 ou de son récepteur, du gène XIAP ou des gènes du complexe NADPH (dont les mutations sont classiquement associées à la granulomatose septique (**Amininejad et al., 2018**)).

## 5.2 Causes proximales

Les principales fonctions biologiques clés forment un réseau de causes proximales. Chaque fonction doit être dans un état « pré-morbide » compatible avec la maladie pour que celle-ci s'exprime. La maladie apparaît lorsque toutes les fonctions sont dans un tel état, selon un schéma parfaitement déterministe. Il est difficile de dresser aujourd'hui une liste exhaustive de toutes les fonctions biologiques impliquées dans la MC mais certaines sont assez bien connues pour expliciter ce qui pourrait correspondre à cet état « pré morbide » (**Hugo et al., 2015**).

- **Microbiote intestinal**

Les MICI sont associés à un déséquilibre du microbiote intestinal connu sous le nom de dysbiose (**Huttenhower et al., 2014**). En particulier, la MC est associée à un excès de bactéries du *phylum des Bacteroidetes* et un déficit de bactéries du *phylum des Firmicutes*.

Elle peut être uniquement la conséquence d'une inflammation clinique ou infraclinique (Craven M, *et al.*, 2012).

- **Perméabilité intestinale et système immunitaire muqueux**

Une augmentation de la perméabilité épithéliale est connue depuis de nombreuses années dans la MC. Elle peut persister entre les poussées et est alors pronostic de la rechute. Elle est aussi observée chez les apparentés sains. Finalement, elle a été associée aux mutations du gène NOD2 et à certaines bactéries commensales (Antoni *et al.*, 2014).

Les lésions de la MC sont caractérisées par la présence de follicules lymphoïdes. Les ulcérations aphthoïdes sont ainsi centrées par des follicules isolés dans le colon ou groupées en amas dans les plaques de Peyer (PP). Les follicules lymphoïdes sont le lieu de la mise en place de la réponse immunitaire muqueuse et il a été montré que celle-ci est exacerbée dans la MC, avec en particulier la présence d'allo-anticorps de type IgA dirigés contre de nombreux produits microbiens (Barreau *et al.*, 2010).

- **Réponse inflammatoire**

Les MICI sont caractérisées par une réponse inflammatoire faisant intervenir de multiples cellules immunitaires : cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes, plasmocytes et polynucléaires. La plupart de ces cellules sont mobiles et capables de circuler dans l'intestin, transportant l'inflammation. Cette inflammation est elle-même sous la responsabilité de facteurs génétiques (ex. IL23R, STAT3, IL12R, JAK2, IL10, etc.) et de facteurs environnementaux (bactéries pathogènes ou saprophytes, additifs alimentaires, etc.) (Hugot *et al.*, 2015).

- **Phénotype inflammatoire**

Le phénotype inflammatoire est le maillon final auquel aboutit la chaîne de causalité. (Neurath *et al.*, 2014)

L'inflammation intestinale de la MC est caractérisée par une augmentation de la concentration en cytokines pro-inflammatoires IL6, TNFa. Ce dernier est produit par les cellules dendritiques, les macrophages, les adipocytes, les fibroblastes et les lymphocytes. Il entraîne une angiogenèse, une augmentation des cytokines pro-inflammatoires, une augmentation de la perméabilité intestinale, une destruction tissulaire et la survie des cellules



T activées. Son rôle clé dans l'inflammation muqueuse est attesté par l'efficacité thérapeutique des anti-TNF (**Deboer *et al.*, 2018**).

## **6. Diagnostic**

Le diagnostic repose sur l'association des examens cliniques et endoscopiques, mais la présence d'anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) possède une sensibilité de 60% et une spécificité de 85%, ce qui est assez bon (**Famularo *et al.*, 2010**).

### **6.1. Imagerie**

L'examen-clé pour poser le diagnostic est l'endoscopie digestive, en particulier la coloscopie qui consiste à introduire dans l'intestin par l'anus un tube souple équipé d'un système optique de visualisation de la paroi intestinale. La coloscopie permet d'examiner le rectum, le côlon et la partie terminale de l'intestin grêle, l'iléon, c'est-à-dire les régions où siègent le plus souvent les atteintes digestives de la MC. Les médecins peuvent ainsi également mesurer l'étendue des lésions intestinales, leur aspect et faire des biopsies c'est-à-dire des prélèvements. Les atteintes sont généralement à différents sites et il n'y a pas de continuité de l'atteinte de la muqueuse digestive. La découverte de granulome au sein des biopsies est quasi spécifique de la maladie. Les biopsies de la muqueuse montrent une infiltration de la paroi intestinale par des cellules de l'immunité (lymphocytes et plasmocytes). (**Andreoli *et al.*, 2010**).

Dans certains cas, des examens radiologiques peuvent être demandés, comme l'IRM ou le scanner abdominal, qui permettent de rechercher la présence de fistules ou d'abcès. Certains chercheurs essayent de voir s'il est possible de quantifier l'importance et l'extension de l'inflammation de la paroi intestinale en IRM. L'échographie abdominale et les radiographies de l'intestin grêle après ingestion d'un produit de contraste sont également utilisées pour la recherche des fistules ou d'une sténose (rétrécissement du diamètre intérieur de l'intestin).

(**Adami *et al.*, 2010**)

### **6.2. Anatomie pathologique**

L'ensemble d'études histologiques et endoscopiques faites sur les prélèvements biopsiques et/ou les pièces opératoires permettent de mettre en évidence la nature et la localisation des lésions. L'apparition de différentes lésions macroscopiques est en fonction de

la durée et de la sévérité de la maladie. Les lésions de la MC ont un aspect plus ou moins identique quel que soit le niveau du tractus gastro-intestinal atteint. (**Khanna et al., 2016**).

## 7. Classification de la maladie de Crohn

La classification de la MC est potentiellement un précieux outil d'aide au suivi du patient malade, notamment en termes d'évolution de la pathologie mais surtout en ce qui concerne le choix d'un traitement adapté. Cependant, elle reste un domaine complexe dans la mesure où il n'existe pas de consensus international et que chaque clinicien a tendance à se référer à une classification différente (**Dalibon, 2015**).

Deux types de classification, de Montréal et de Vienne (ou Paris), sont en vigueur pour classer les différentes formes de MC selon trois critères : l'âge du diagnostic, la localisation des lésions et le type de maladie ou l'intensité de la maladie.

Cependant ces classifications sont actuellement fortement remises en question étant donné que ces phénotypes sont liés à la localisation primaire des lésions et varient au cours de l'évolution de la maladie chez un même individu (**Laas et al., 2014**).

Dans Montréal : L4 peut être à L1 à3 en cas d'atteinte concomitante du gros intestin, P peut être associé à B1 à3. 4.1.

### 7.1 Classification de la MC en fonction de l'âge

Selon la dernière classification proposée, celle de Montréal, trois catégories d'âge sont déterminées : avant 17 ans, entre 17 et 40 ans et après 40 ans. Ces trois catégories correspondent aux formes pédiatriques, aux formes classiques de l'adulte jeune et aux formes plus rares de la personne âgée. Ces distinctions phénotypiques correspondent bien à des réalités cliniques et évolutives différentes. Les formes pédiatriques ont des localisations souvent plus étendues, y compris digestives hautes. Ces localisations varient plus dans le temps : les localisations iléales, par exemple, apparaissant souvent dans l'adolescence. Les formes de la personne plus âgée sont plus souvent coliques, souvent moins évolutives et, de plus, doivent faire exclure une cause vasculaire, surtout au-delà de 60 ans.

Dans la classification de Vienne, l'âge du diagnostic se divise en 2 catégories : <40 ans, ce sont les adultes jeunes et Au-delà de 40ans ,ce sont les formes des personnes plus âgées, beaucoup plus rare , elle sont souvent moins invalidantes . (**Saussure et Bouhnik, 2007**).

## 7.2 Classification de la MC en fonction de la localisation

La localisation de la maladie est classée en forme iléale pure (partie finale de l'intestin grêle), forme colique pure et forme iléo-colique, et un sous-phénotype additionnel, pouvant coexister avec un des trois sous phénotypes principaux : les atteintes du tube digestif supérieur (atteinte proximale au tiers distal de l'iléon). Dans les MC de l'adulte, la localisation tend à rester stable dans le temps, tandis que dans les formes pédiatriques, la proportion de changement au fil du temps est significativement plus importante. Cette classification fondée sur la localisation est très pertinente, car elle est associée à d'importantes caractéristiques cliniques et même étiopathogéniques. (Saussure et Bouhnik, 2007).

## 7.3 Classification de la MC en fonction du type

Le type de la maladie est défini comme purement inflammatoire, sténosante ou fistulisante. A ces caractères principaux, mutuellement exclusifs, peut s'ajouter un caractère supplémentaire pouvant coexister avec chacun d'entre eux : l'existence de lésions péri-anales de la maladie (Laas et al., 2014).

- **Forme fistulisante** : L'inflammation de la séreuse et du mésentère entraîne l'adhésion par des bandes fibreuses des anses intestinales entre elles, pouvant aboutir à la formation de fistules caractéristiques de la maladie. Celles-ci prennent naissance dans des ulcérations, puis percent graduellement la séreuse et les organes adjacents. Ces fistules font communiquer les anses intestinales entre elles ou avec le côlon, la peau, le périnée, la vessie, le vagin. Elles peuvent aussi communiquer avec des abcès situés dans la cavité péritonéale, le mésentère ou les structures rétropéritonéales. La présence d'ulcères périanaux est également caractéristique de cette forme (Peyrin-Biroulet, 2011).

- **Forme sténosante**: La présence d'une inflammation, d'une fibrose cicatricielle et d'un œdème entraîne un rétrécissement de la lumière intestinale causant ainsi ballonnement, nausées, vomissement de matières fécales et constipation. Cette sténose peut devenir complète et entraîner une obstruction intestinale aiguë (Laas et al., 2014).

- **Non fistulisante non sténosante** : Il s'agit de formes purement inflammatoires, n'ayant jamais eu de complications au cours de la maladie, souvent localisées au colon.

## 8. Stratégies thérapeutiques

Les thérapeutiques actuelles permettent en premier lieu : de traiter les poussées de la maladie (douleurs abdominales, diarrhée, etc..) cela constitue le traitement d'attaque. Puis de prévenir les rechutes, les complications avec un traitement d'entretien (à prendre de façon régulière) et surtout ainsi d'éviter le délabrement intestinal. L'objectif du traitement médical est d'induire et de maintenir une rémission clinique sans stéroïdes, de prévenir les complications et la chirurgie et d'améliorer la qualité de vie du patient.

Le traitement de la MC dépend de la gravité de la maladie, de la localisation de la maladie et du sous-type de maladie. Le choix du traitement va dépendre de la localisation des lésions, de l'intensité des symptômes, de la présence éventuelle de complications et de manifestations extra-intestinales, mais aussi de la tolérance du patient aux traitements. Il faut arriver à un rapport bénéfice-risque optimal (**Boirivant *et al.*, 2012**).

Les facteurs de risque d'activité agressive de la maladie comprennent un âge de diagnostic inférieur à 30 ans, une atteinte anatomique étendue, une maladie périanale, des ulcères profonds, une intervention chirurgicale antérieure et une sténose et / ou une maladie pénétrante. L'un des plus grands défis associés à la MC est qu'après 20 ans d'activité de la maladie, 80% des patients nécessiteront une intervention chirurgicale et environ 30% nécessiteront une intervention chirurgicale dans les 5 ans suivant le diagnostic. Bien que le but de la thérapie médicale soit de maintenir la rémission sans avoir besoin de chirurgie, une fois que des complications de sténose et / ou de fistulisation surviennent, une chirurgie peut être nécessaire. Malheureusement, comme la chirurgie n'est pas curative pour la MC, de nombreux patients auront besoin de plusieurs chirurgies au cours de leur vie. Il existe un certain nombre de médicaments différents utilisés pour traiter la MC. (**Bernstien *et al.*, 2012**)

Les antibiotiques sont également utilisés dans la MC, mais les preuves à l'appui leur utilisation est également limitée. Le rôle principal des antibiotiques est de traiter les complications suppuratives ou périanales de la MC.

Les immunosuppresseurs sont utilisés depuis de nombreuses années pour traiter la MC, mais en raison de la lenteur de leur action (2 à 3 mois), ils sont généralement utilisés pour maintenir la rémission. (**Rowe *et al.*, 2012**)

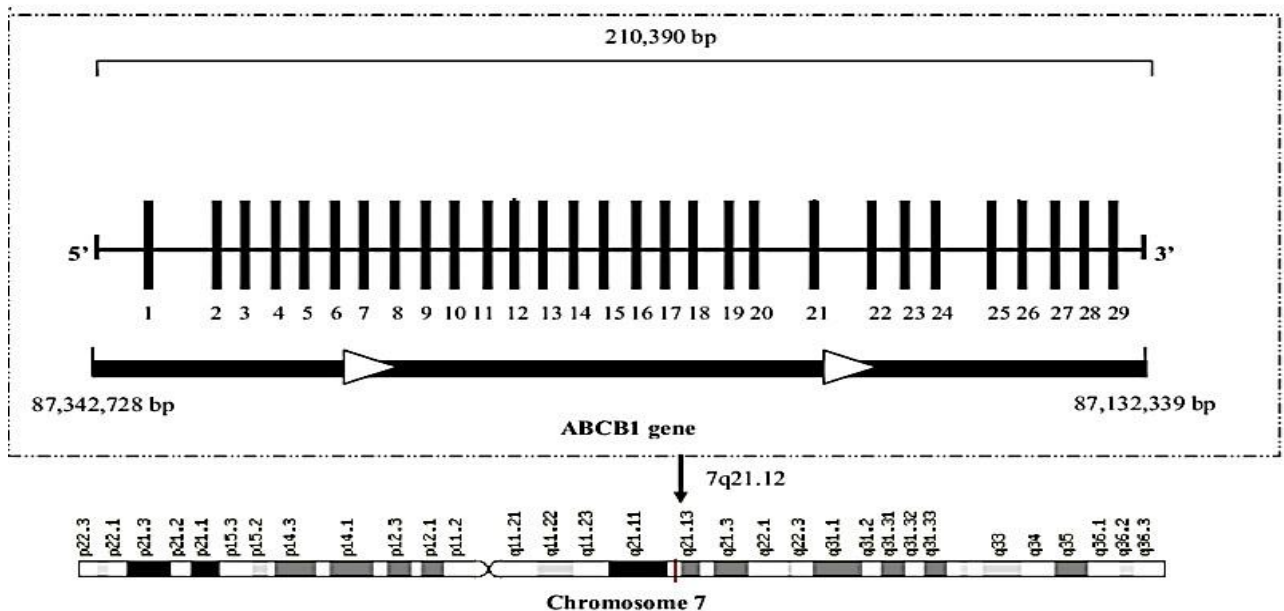
*LE GENTE ABCB1*

## 1. ATP binding cassette *B1* (*ABCB1*)

Les gènes ABC codent pour des protéines de transport et de canal possédant plusieurs domaines couvrant la membrane qui forment un pore, et des domaines de liaison aux nucléotides intracellulaires pour la translocation dépendante de l'ATP de substrats ou d'ions à travers la membrane cellulaire. Bien que les protéines ABC bactériennes fonctionnent à la fois comme importateurs et exportateurs, toutes les protéines ABC eucaryotes sont des pompes à efflux (*Hwang et al., 2016*).

Le gène polymorphe *ABCB1* mieux connu sous le nom de *multidrug resistance 1* (MDR1) est l'un des 49 membres putatifs de la superfamille des transporteurs ABC humains au sein de la sous-famille B, qui est l'une des sept sous-familles phylogénétiquement distinctes avec une spécificité de substrat qui se chevauchent. *ABCB1* (MDR1) est l'un des nombreux gènes omniprésents de la cassette de liaison à l'adénosine triphosphate (ATP) (*Binkhathlan et al., 2013*).

Le gène *ABCB1* est composé de près de 210kb, sur le bras long du chromosome 7, en position 7q21.1. Il est constitué d'une région promotrice et de 28 exons (3843 paires de bases) (*Zhang et al., 2014*).



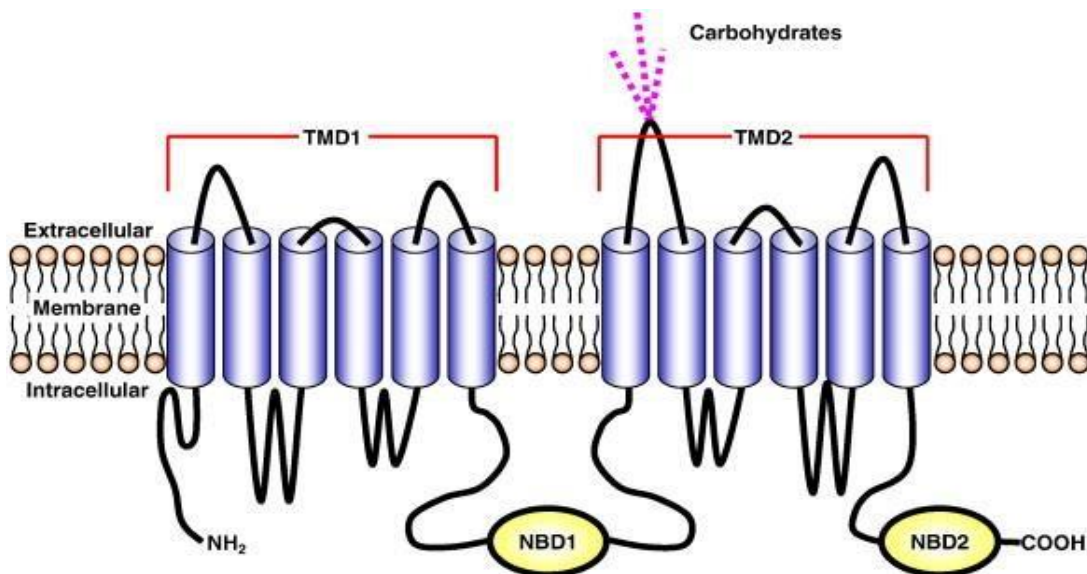
**Figure 4** : schéma représentant la position du gène *ABCB1* sur le chromosome 7 (*Zhang et al., 2014*).

## 2. Produit de gène

L'ARN messenger (ARNm) a une longueur de 4872 pb, y compris la région non traduite 5', ce qui donne naissance à une protéine de 1280 acides aminés de longueur, nommée Pglycoprotéine (P-gp). Elle présente une masse moléculaire de 170 kDa. (Ward *et al.*, 2013).

La P-gp est modifiée post-traductionnellement par phosphorylation et N-glycosylation. La glycoprotéine P a été découverte en 1976 par JULIANO et LING sur des cellules d'ovaires de hamster chinois sélectionnées pour leur résistance à la colchicine. Ils découvrirent alors que cette résistance était due à la présence d'une protéine de surface qui limitait la perméabilité membranaire à la colchicine, et que cette "glycoprotéine de perméabilité" n'était pas présente en quantité égale à la surface de toutes les cellules (Azzaria *et al.*, 1989).

La structure secondaire de la P-gp est composée de deux sous-unités ayant 43% d'homologie de séquence, suggérant une duplication du gène ancestral. Chacune de ces deux sous-unités contient un domaine transmembranaire (DTM) constitué de six segments en hélices  $\alpha$  qui traversent de part et d'autre la membrane plasmique (sTM) : DTMI ; segments TM de 1 à 6 et DTM2 ; segments TM de 7 à 12. De plus, chacune des sous-unités possède un domaine cytoplasmique, le domaine de liaison nucléotidique (NBFs), composé d'une séquence consensus de liaison à l'ATP (Kim *et al.*, 2018).



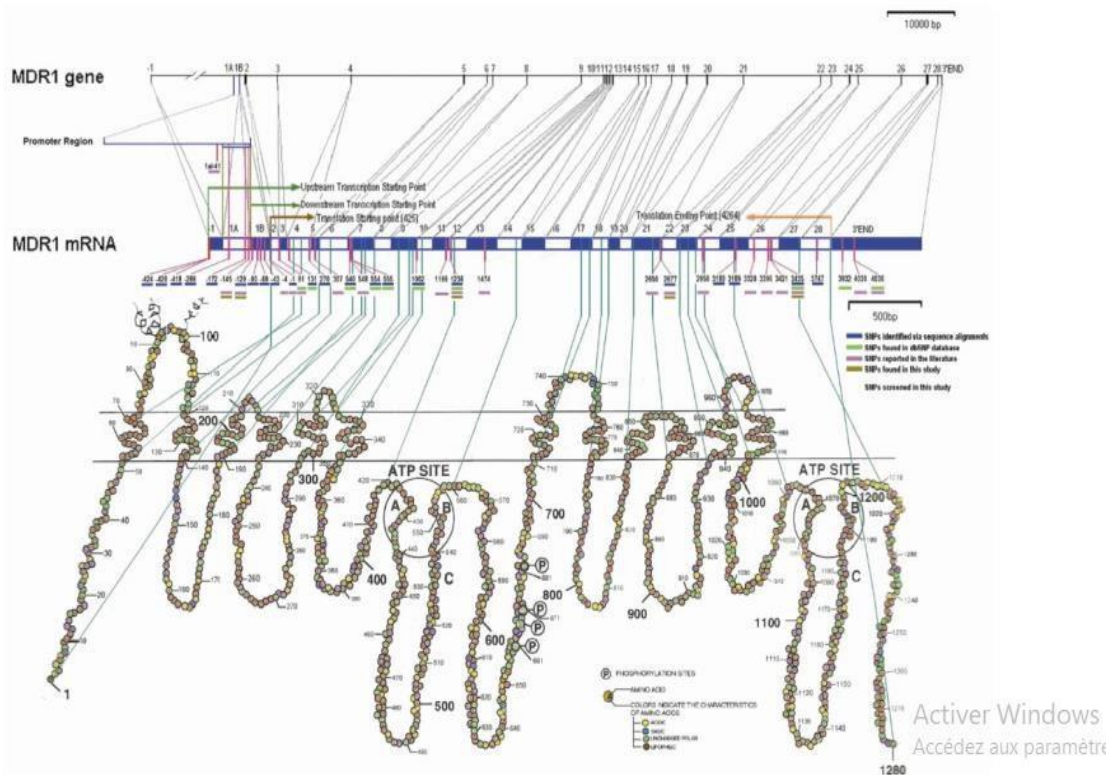
**Figure 5** : Structure en 2 dimensions du transporteur ABCB1 (Verhalen *et al.*, 2017).

Les 12 hélices transmembranaires forment une protéine toroïdale avec un pore aqueux.



Deux domaines de liaison aux nucléotides pour la protéine se trouvent dans le cytoplasme. Le pore est tapissé d'acides aminés hydrophobes et aromatiques au niveau de la moitié du pore faisant face à l'extracellulaire, tandis que la partie du pore faisant face au cytosolique contient des résidus polaires chargés (Verhalen *et al.*, 2017).

L'analyse structurale révèle deux ouvertures dans la protéine au niveau de la bicouche lipidique pour permettre l'extraction des substrats directement de la membrane lors de leur diffusion passive dans la cellule. Plusieurs résidus hautement conservés dans le pore sont capables de reconnaître une gamme variée de substrats. La protéine présente une flexibilité conformationnelle élevée pour permettre des réarrangements structurels dans les substrats de liaison et d'efflux (Frances *et al.*, 2006).



**Figure 6:** Schéma du gène *ABCB1*, de l'ARNm, et de la structure secondaire de la protéine. (Tang *et al.*, 2002).

La P-gp est exprimée de manière polarisée dans la membrane plasmique des cellules des organes de barrière et d'élimination, où elle a des fonctions protectrices et excrétrices. La P-gp joue un rôle important dans l'élimination de premier passage des médicaments



administrés par voie orale afin de limiter leur biodisponibilité en effluxant les médicaments des épithéliums faisant face à la lumière de l'intestin grêle et du côlon, et des canalicules du foie face à la bile. Elle élimine les substrats de la circulation systémique du côté face à l'urine de la membrane de bordure en brosse des tubules proximaux dans le rein, et à nouveau par excrétion biliaire ; et limite la perméabilité des médicaments dans les organes «sanctuaires» du côté apical ou séreux des barrières sang-tissu (par exemple sang-cerveau, sang-liquide céphalo-rachidien, sangplacenta, barrières hémato-testiculaires) **(Rothenberg et al., 1989)**.

Le domaine présumé de liaison aux xénobiotiques est une poche principalement formée de résidus hydrophobes et aromatiques. Parmi les 73 résidus accessibles au solvant, dans la cavité interne, seuls 15 sont polaires, et 2 seraient potentiellement chargés. Cela explique que les substrats de la P-gp soient majoritairement des substances hydrophobes. Une fois la substance liée à la poche hydrophobe de reconnaissance du substrat, les domaines de liaison aux nucléotides hydrolysent deux molécules d'ATP. Ceci induit un changement conformationnel du transporteur ce qui permet un relargage des substances dans le milieu extracellulaire via le canal transmembranaire **(Borgnia et al., 1996)**.

Par la suite, l'implication de la glycoprotéine P dans la résistance à un certain nombre de thérapies anticancéreuses suscitera un vif intérêt : certaines cellules sont capables de développer une tolérance croissante à un agent cytotoxique quand sa concentration augmente dans le milieu de culture. On parle de phénotype "*MultiDrug Resistance*" car, dans le cas de la P-gp, un grand nombre de substances sont concernées, sans analogie de structure bien définie **(Vivaldi et al., 2021)**.

### 3. Polymorphisme du gène *ABCB1*

D'après Hoffmeyer et al., la majorité des individus possède au moins un allèle muté dans le gène *ABCB1* **(Hoffmeyer et al., 2000)**, A l'heure actuelle, plus de 50 polymorphismes (ou SNPs pour Single Nucleotide Polymorphisms) ont été reportés sur ce gène **(Amanda et al., 2020)**.

Certains de ces polymorphismes sont dans la région promotrice, d'autres dans les exons ou encore dans les introns (Figure 8). En fonction de leur localisation et de la nature de la mutation, les polymorphismes peuvent avoir un effet sur l'expression ou l'activité du transporteur de différentes manières :

- Changement d'acide aminé,
- Atteinte de la séquence du promoteur,
- Atteinte de la stabilité de l'ARNm, - Atteinte du processus d'épissage.

Plusieurs polymorphismes retiendront par la suite notre attention dans cette étude car, d'une part, leur fréquence est élevée dans la population caucasienne et d'autre part, ils ont été associés dans la littérature à des modifications de l'expression et/ou de l'activité du transporteur ABCB1. Il s'agit de :

- **T-129C** dans l'exon 1b, se situe 7 paires de base en aval du site d'initiation de la transcription dans la région promotrice (**Vasilopoulos et al., 2014**).

- **G-1A** est localisé dans l'exon 2 au niveau du nucléotide qui précède directement le codon ATG qui initie la traduction et pourrait ainsi affecter cette traduction (**Jeannesson et al., 2009**).

- **A61G** localisé dans l'exon 2 près de l'extrémité N-terminale de la protéine est responsable de la substitution d'une Asparagine en position 21 par un acide aspartique (**Bergmann et al., 2011**).

- **G1199A** dans l'exon 11 se traduit par la substitution d'une sérine par une asparagine en position 400 de la chaîne d'acides aminés. Cette substitution est localisée dans la boucle cytosolique près du premier domaine de liaison à l'ATP. Elle entraîne une modification importante de la taille de la chaîne latérale de la protéine et pourrait changer sa charge et sa structure (**Bergmann et al., 2011**).

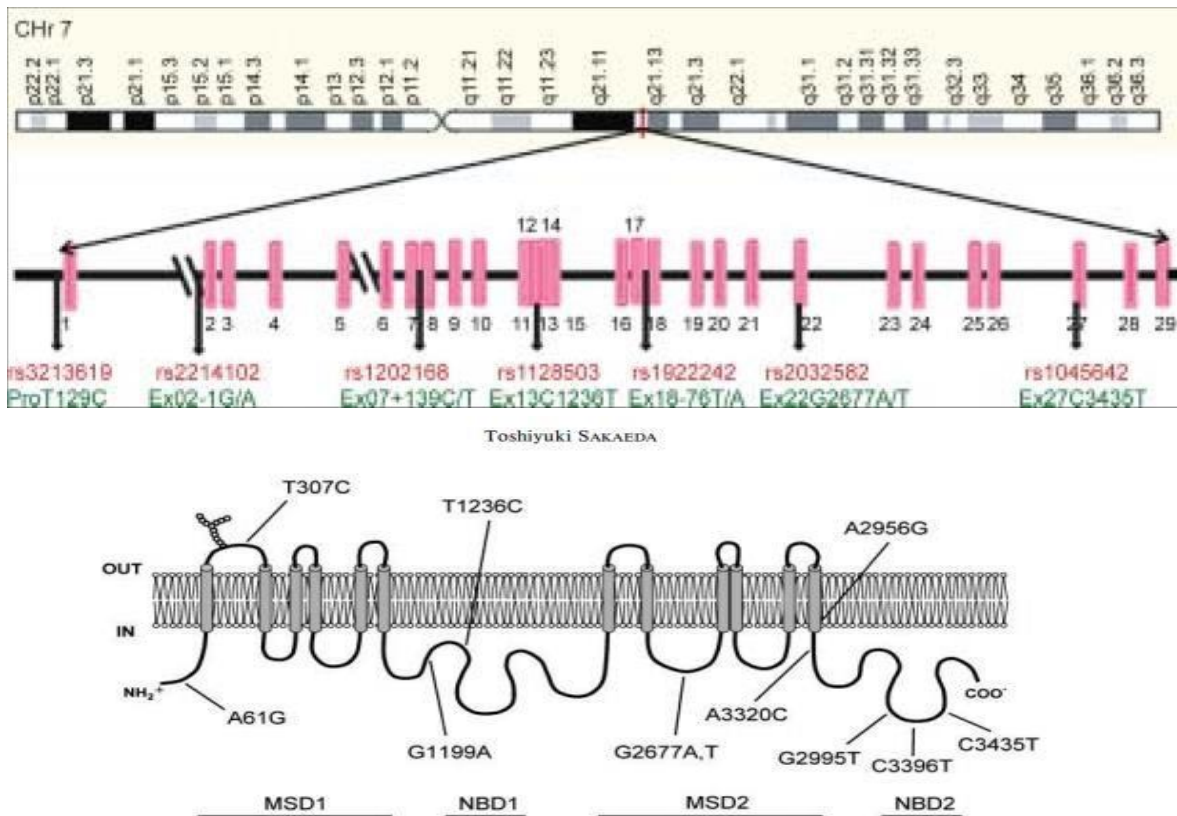
- **C1236T** est un polymorphisme silencieux situé dans l'exon 12. L'effet de ce polymorphisme est controversé puisqu'il est situé dans une région non codante et non promotrice. D'après certains auteurs il serait dû à un déséquilibre de liaison entre C3435T et G2677T/A et/ou C1236T (**Khosravi et al., 2021**).

- **T-76A** est localisé dans l'intron 16 près d'un site de jonction entre exons (**Vasilopoulos et al., 2014**).

-

- **G2677T/A** est un polymorphisme triallélique de l'exon 21 lié à la substitution d'une Guanine par une Thymine ou une Adénosine. Ces mutations sont associées à une substitution d'alanine respectivement en sérine ou en thréonine en position 893 de la chaîne d'acides aminés. Ce polymorphisme localisé du côté intracellulaire de la protéine après la dixième région transmembranaire entraîne le remplacement d'un acide aminé apolaire par un acide aminé polaire. Cela pourrait affecter la structure secondaire et la conformation de la protéine ainsi que la précision de l'interaction avec ses substrats (**Khosravi et al., 2021**).

- **C3435T** est un polymorphisme de l'exon 26. Cette mutation n'est pas associée à un changement d'acide aminé et est située à une position non codante. C'est un polymorphisme dit synonyme ou silencieux (**Vencatto et al., 2019**).



**Figure 7** : Localisation des polymorphismes du gène *ABCB1* (**Manna et al., 2009**).

## 4. Effet des polymorphismes

Que ce soit au niveau des données d'expression ou d'activité ou des données de pharmacocinétique, la littérature n'a pas clarifié les associations entre génotypes et activité d'*ABCB1* ; l'effet des polymorphismes étant souvent controversé d'une étude à l'autre

- **Modulation de l'expression et/ou de l'activité du transporteur**

Certains polymorphismes d'*ABCB1* ont été associés avec une altération de l'expression de l'ARNm d'*ABCB1*, de l'expression de la protéine ou de l'activité du transporteur in vitro ou dans différents tissus notamment l'intestin (**Hodges et al., 2020**).

- **Effet associés à la prise de médicaments**

En modifiant l'expression et/ou l'activité d'*ABCB1*, les polymorphismes pourraient moduler la pharmacocinétique (absorption, distribution tissulaire et excrétion) de certains substrats médicamenteux et modifier la réponse biologique à ces traitements (efficacité, survenue d'effets indésirables (**Vencatto et al., 2019**)).

## **5. Corrélation ABCB1 et maladie de crohn**

La P-gp semble avoir une grande importance dans le maintien de l'homéostasie intestinale et dans la protection des cellules épithéliales intestinales contre la toxicité des xénobiotiques ainsi que les substances nocives ; Il a été démontré que la réduction de la fonction et de l'expression de la P-gp est associée à des troubles inflammatoires de l'intestin. (**Yakusheva et al., 2018**).

Une expression accrue du gène ABCB1 a été découverte chez des patients atteints de MC qui ont dû subir une résection intestinale et chez des patients atteints de RCH qui ont dû subir une colectomie en raison de l'inefficacité du traitement médicamenteux.

Les polymorphismes du gène ABCB1 influenceraient ainsi la susceptibilité aux maladies inflammatoires chroniques donc pouvaient prédisposer au développement d'une MC. Résultats observés chez des souris invalidées pour le gène MDR1(ABCB1) ; la perte de la fonction de barrière liée à la baisse de production de P-gp chez des sujets mutés indique que cette mutation constitue un terrain génétique prédisposant au développement d'une MC (**Brinar et al., 2013**).

## 6. Corrélation G2677T/A et maladie de crohn

Que ce soit au niveau des données d'expression ou d'activité ou des données de pharmacocinétique, la littérature n'a pas clarifié les associations entre génotypes et activité d'ABCB1 ; l'effet des polymorphismes étant souvent controversé d'une étude à l'autre.

Conformément aux preuves moléculaires, certaines études ont trouvé des associations entre ces variantes et la MC ; cependant, d'autres ne l'ont pas fait (**Alfreda et al., 2011**).

Ces résultats contradictoires peuvent être le résultat de l'hétérogénéité ethnique, de la variabilité de la puissance de l'étude, de l'examen d'un nombre limité de variantes génétiques, de la stratification phénotypique différente et/ou de la variabilité des facteurs environnementaux/expositions entre les populations (**Alfreda et al., 2009**).

Le variant triallélique G2677T/A dans l'exon 21 est supposé influencer le niveau, l'activité et la fonction de la P-gp et ainsi influencer le transport et l'absorption de divers substrats (**Brinar et al., 2013**). Ce SNP a été associé à une augmentation de l'expression de l'ARNm dans les entérocytes duodénaux de sujets sains et dans le cœur . Par contre, l'homozygotie pour l'allèle muté en 2677 a également été associée à une plus faible expression de la protéine dans le placenta ont montré in vitro une augmentation de l'activité du transporteur dans des cellules exprimant le variant 893Ser (diminution de la moitié de la concentration intracellulaire en substrat) bien que le taux d'expression d'ABCB1 soit identique dans les cellules porteuses de Ala893 ou 893Ser (**Yang et al., 2015**).

*Patients*  
*Et Méthodes*

Il s'agit d'une étude transversale de type cas témoins ; Cette étude a été réalisée entre mars et Juin 2021, et a porté sur deux type de populations : une population de 15 témoins présumées saines et une population de 7 patients diagnostiqués d'une MC.

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de pédagogie de la faculté Science de la Nature et de la vie et le laboratoire de recherche de Biologie Moléculaire et cellulaire de l'université Constantine 1

### **1- L'échantillonnage**

Notre étude a porté sur 22 sujets répartis en deux groupes ; une population malade présentant la MC et une population témoins. Des critères d'inclusions et d'exclusion ont été établis pour la population malade ainsi que pour la population témoins.

#### **❖ Population de témoins :**

Les témoins sont recrutés à partir d'une population prise au hasard, supposée saine, leurs âges s'échelonne de 16 à 75 ans, Nous avons recruté 15 témoins des deux sexes. Un questionnaire est établi pour chaque individus (**Annexes 1 et 2**).

#### **– Critères d'inclusion :**

Sujets âgés de 30 à 70 ans et sans antécédents familiaux de MC

#### **– Critères d'exclusion :**

Sujet âgés de moins de 30 ans et/ou avec antécédents familiaux de MC

#### **❖ Population de malades :**

Elle comprend 7 échantillons d'ADN de patients atteints par MC. Ces échantillons ont été pris de la banque d'ADN du laboratoire de recherche de biologie et génétique moléculaire de l'université Constantine 3 et qui répondaient aux critères suivants :

- **Critères d'inclusion :**
  - ✓ Patients âgés de plus de 15 ans.
  - ✓ Patients suivis pour une MC, quel que soit le stade évolutif et la localisation de la maladie.
- **Critères d'exclusion :**
  - ✓ RCH : recto colite ulcéro hémorragique
  - ✓ Colites inclassables

Chaque individu participant à notre recherche devait fournir un consentement éclairé par la signature d'un formulaire de consentement explicitant les implications et les limites de leur participation à l'étude (**Annexe 3**).

### 2. Prélèvement sanguin

Le prélèvement sanguin est la première étape à être réalisée après le recrutement des sujets, certaines conditions doivent être respectées :

- Le prélèvement se fait au patients répondent aux critères d'inclusions de notre étude
- L'accord du patient et l'obtention de son consentement sont obligatoires.
- Le prélèvement est effectué dans un tube EDTA, un total de 6 à 8 ml du sang sous vide est prélevé pour chaque cas
- . - Les tubes sont conservés à une température de 4°C jusqu'au moment des manipulations.

### 3. matériel d'étude moléculaire

Nous avons utilisé la technique de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) qui nécessite une succession d'étapes méthodologiques : une extraction de l'ADN, un contrôle qualitatif et quantitatif de l'ADN, la PCR suivie de la digestion enzymatique (RFLP) pour évaluer le polymorphisme du gène d'étude et finalement l'analyse des produits de digestion par électrophorèse sur gel d'agarose. Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de biologie moléculaire de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université des frères Mentouri Constantine 1 ainsi qu'au laboratoire de recherche de biologie cellulaire et moléculaire de l'université des frères Mentouri Constantine 1



## 3.1 Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN contenu dans les cellules. Il existe de nombreux protocoles d'extraction, celui utilisé dans notre étude est la méthode au NaCl. Les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN.

Les leucocytes sont séparés du sang total par une lyse hypotonique et traités ensuite par un détergent Sodium Dodécyle Sulfate (SDS) et une protéinase K. Ainsi, l'ADN nucléaire est libéré dans le milieu. La pelote d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation par l'éthanol. L'ADN est solubilisé en phase aqueuse.

### Technique d'extraction de l'ADN :

- **Préparation des leucocytes :**
  - ✓ Dans un type Falcon de 50 ml ; mettre le sang total et compléter à 25ml avec du (TE) tris EDTA20 :5. Laisser 10 min dans la glace.
  - ✓ Centrifuger 10 min à 3900g (3800rpm).
  - ✓ Aspirer le surnageant avec la trompe à vide.
  - ✓ Ajouter quelques ml de TE20 :5 au culot et le remettre en suspension avec une pipette stérile.
  - ✓ Compléter à 25 ml avec du TE 20 :5 au culot et laisser 10 min dans la glace.
  - ✓ Centrifuger dans les mêmes conditions précédentes.
  - ✓ Aspirer le surnageant avec la trompe à vide : obtention du culot leucocytaire.
- **Extraction de l'ADN**
  - ✓ Transvaser le culot de leucocytes dans un tube Falcon de 15 ml.
  - ✓ Ajouter 3ml de tampon de lyse en dilacérant le culot avec passette stérile.
  - ✓ Ajouter 200 µl de SDS à 10%.
  - ✓ Ajouter 100µl de protéinase K à 10mg/ml.
  - ✓ Agiter le tube sur une roue à 37 °C pendant une nuit.  
Tris : 2.422g/l.  
EDTA : 1.86 g/l.  
Ajuster le PH avec HCL 1N. (**Annexe : 6**)

### 3.2 Estimation de la qualité et de la quantité d'ADN

#### ➤ Estimation qualité de l'ADN :

La contamination de l'ADN extrait, a été appréciée en mesurant la densité optique des extraits à 260 et 280 nm qui correspondent, respectivement, aux longueurs d'onde d'absorption des acides nucléiques et des protéines. Le rapport de DO à 260 nm sur la DO à 280 nm est calculé pour s'assurer que l'ADN est dépourvu de toute contamination soit de protéines ou d'ARN.

- Si le rapport  $DO_{260}/DO_{280}$  est compris entre 1,6 et 2 → l'ADN est suffisamment pur.
- Si le rapport  $DO_{260}/DO_{280} > 2$  → l'ADN est contaminé par les ARN.
- Si le rapport  $DO_{260}/DO_{280} < 1,6$  → l'ADN est contaminé par les protéines.

L'ADN pur est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation, et dans le cas de contamination, une réextraction est nécessaire pour un bon usage.

#### ➤ Estimation quantité de l'ADN :

##### Principe :

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

<b>1 unité de DO 260 nm = 50 <math>\mu\text{g}</math> / <math>\mu\text{L}</math> d'ADN double brin</b>
--

En prenant en considération que l'ADN obtenu est dilué à 1/100, la quantité obtenue est multipliée par 100 on conclue que la concentration sera facilement calculé grâce à la formule suivante :

<b>La concentration de l'ADN en <math>\mu\text{g}</math> / <math>\mu\text{L}</math> = facteur de dilution <math>\times</math> DO 260 <math>\times</math> 50 <math>\mu\text{g}</math> / <math>\mu\text{L}</math></b>
---

### 3.3 Génotypage du polymorphisme :

Pour la mise en évidence de polymorphisme G2677T du gène ABCB1 ; nous avons utilisé la technique de PCR/RFLP qui comprend la réalisation des étapes suivantes :

- Amplification par PCR.
- Un contrôle des produits PCR par Une électrophorèse sur gel d'agarose
- Digestion du produit de PCR par l'enzyme de restriction spécifique à chaque polymorphisme.

- Une migration électrophorétique sur gel d'agarose pour la séparation des produits de digestion.

### 3.3.1 L'amplification par PCR :

La technique PCR est une technique de biologie moléculaire permet l'amplification exponentielle d'un fragment d'ADN à l'aide d'un mélange réactionnel contenant des amorces spécifiques à la séquence d'ADN à amplifier et de désoxy-ribonucléotides triphosphates. Ainsi, l'utilisation d'une enzyme polymérase thermophile rend possible la dénaturation et renaturation cyclique des fragments amplifiés et la production de quantités importantes d'ADN en peu de temps. Les cycles d'amplification sont parfois précédés d'une dénaturation de 5 min à 95°C, cette procédure est communément appelée *hot start*, un cycle d'amplification produit trois températures différentes qui composent trois étapes:

- ✓ **Dénaturation** : La première étape s'effectue à une température de 96°C à 94°C, dite température de dénaturation. À cette température, l'ADN matriciel, qui sert de matrice au cours de la réplication, est dénaturé : les liaisons hydrogène ne peuvent pas se maintenir à une température supérieure à 80°C et les ADN double-brin se dénaturent en ADN simple-brin (ADN monocaténares).
- ✓ **Hybridation** : La deuxième étape s'effectue à une température généralement comprise entre 50 et 70°C, dite température d'hybridation des amorces. La diminution de la température permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider. Les amorces, courtes séquences monocaténares complémentaires de régions qui flanquent l'ADN à amplifier, s'hybrident plus facilement que les longs brins d'ADN matriciel. Le choix de la température d'hybridation résulte d'un compromis entre plusieurs paramètres. Elle est calculée en fonction de la longueur et de la séquence des amorces.

**Elongation** : La troisième période s'effectue à une température de 72°C, dite température d'élongation. À 72°C, la Taq polymérase se lie aux ADN monocaténares amorcés et catalyse la réplication en utilisant les désoxy-ribonucléotides triphosphates.

Le déroulement des cycles de la PCR est assuré par un appareil programmable appelé thermocycleur et les conditions d'amplification sont caractéristiques à chaque gène.

Parallèlement un échantillon sans ADN (blanc) est inclus dans la série à amplifier et sert de control négatif.

□ Réactifs utilisés pour la PCR

- **Les enzymes :** L'enzyme Taq DNA est extraite de la bactérie *Thermophilus aquaticus*, elle est thermorésistante, sa température optimale d'action est de 72°C. C'est une enzyme capable d'associer des nucléotides en polymère d'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'.
- **Les tampons :** On utilise 2,5 µl de tampon pour un volume final de 25 µl par tube de PCR. Le tampon nommé 10X PCR Buffer
- **Les oligonucléotides :** Les dNTP(dATP, dTTP, dGTP, dCTP). Ce sont les éléments de bases utilisés par la Taq-polymérase pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires lors de l'élongation.
- **Le MgCl<sub>2</sub> :** est un cofacteur pour la Taq-polymérase. Il est utilisé à une concentration stock de 25 Mm.
- **Les amorces :** Les amorces sont conçues pour reconnaître par complémentarité une séquence située en amont d'une part le brin 5' → 3' du fragment d'ADN d'intérêt et d'autre part une séquence située en amont du brin complémentaire (3' → 5') du même fragment d'ADN

**Tableau 2 :** les conditions de la réalisation de la PCR

Gène et polymorphisme	Amorces	Programme PCR
ABCB1 G2677T	5'TGCAGGCTATAGGTTCCAGG3' 5'TTTAGTTTGACTCACCTTCCCG3'	<b>Dénaturation initial :</b> 95° → 5min <b>Cycle : 35 cycles</b> 95° → 30 sec 55° → 30sec 72° → 45sec <b>Elongation final :</b> 72° → 10 min

**Tableau 3 :** Préparation du milieu réactionnel de la PCR

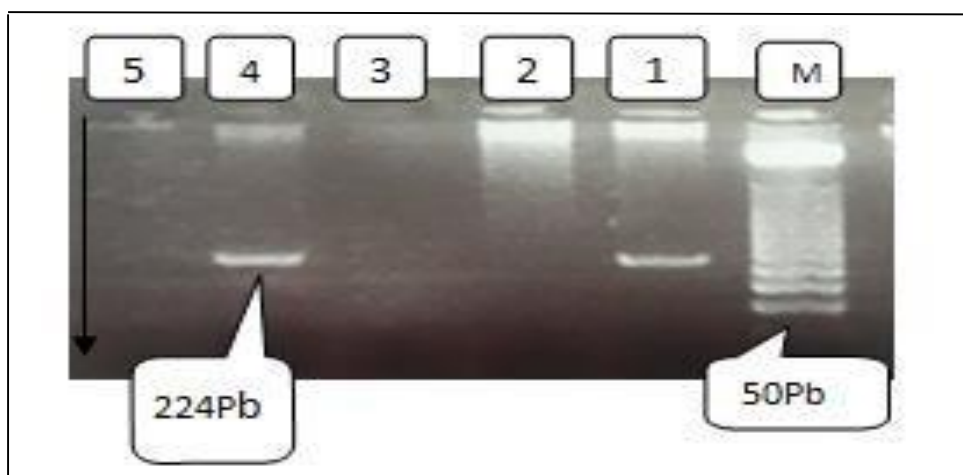
Mix de PCR	Concentrations	Quantités $\mu\text{l}$ pour un échantillon
Eau distillé		16.6 $\mu\text{l}$
Tampon	10X	2.5 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub>	(25mM)	1.5 $\mu\text{l}$
dNTP	(5mM)	2 $\mu\text{l}$
Amorce F	(10pM)	0.5 $\mu\text{l}$
Amorce R	(10pM)	0.5 $\mu\text{l}$
Taq polymérase		0.4 $\mu\text{l}$
ADN cible		1 $\mu\text{l}$

### 3.3.2 Un contrôle des produits PCR par Une électrophorèse sur gel d'agarose

Le contrôle des produits PCR s'effectue par électrophorèse sur un gel d'agarose 2 % additionné de 10  $\mu\text{l}$  du Bromure d'Ethidium (BET). Le gel est déposé sur une plaque d'une cuve horizontale.

Dans chaque puits du gel, nous déposons 10  $\mu\text{l}$  d'amplifia en présence de 2  $\mu\text{l}$  du colorant Bleu de Bromophénol (BBP) qui permet de suivre le front de migration. Les acides nucléiques chargés négativement, sont déposés du côté de la cathode et migrent vers l'anode dans le champ électrique. La migration des fragments d'ADN dépend de leurs tailles. Le dépôt se fait du coté cathode et système est soumis à une migration sous un courant de 100 volts pendant 30 mn.

Après la migration, le gel est soumis au rayon UV et photographié. Les molécules de BET s'intercalent entre les bases nucléotidiques de l'ADN et émettent une coloration rouge. Les fragments amplifiés sont visible sous forme de bandes fluorescentes de même taille pour chaque gène. Ce control permet aussi de vérifier si une éventuelle contamination de l'ADN est survenue au cours de PCR grâce au puits contenant le blanc.



**Figure 8:** Profil électrophorétique sur gel d’agarose des fragments issus par le clivage du *BanI* présentant le génotype de gène ABCB1.

**3.3.3. La digestion des produits PCR :**

Les produits PCR sont soumis à une digestion enzymatique par l’enzyme de restriction conforme pour la détection du polymorphisme G2677T

Ces modifications de l’ADN sont détectées par des variations du nombre et de la longueur des fragments de restriction obtenus après digestion enzymatique.

La digestion est réalisée par l’addition de 1µl de l’enzyme de restriction *BanI* suivie d’une incubation pendant une nuit dans une étuve à 37°C.

**Tableau 4:** Résultats attendu des tailles obtenus de digestion enzymatique

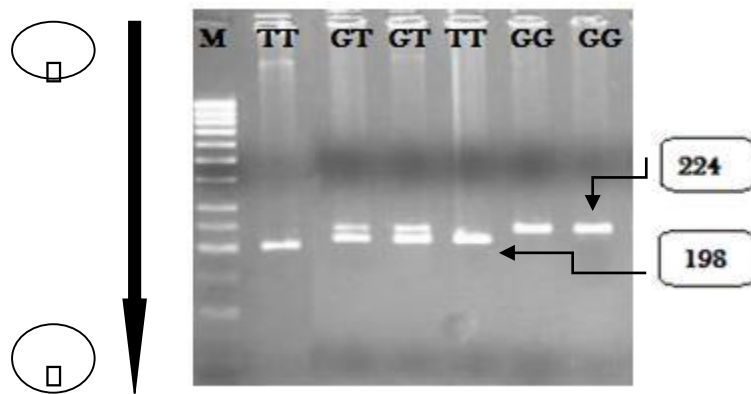
Polymorphisme	Enzyme de restriction	Génotypage	Longueur du fragment en pb
G2677T	<i>BanI</i>	GG	224 pb
		GT	224, 198 et 26 bp
		TT	198 et 26 bp

**3.3.4. L’électrophorèse des produits de la digestion :**

Les fragments d’ADN digérés par l’enzyme de restriction sont séparés par électrophorèse sur gel d’agarose 3% pour le polymorphisme G2677T du gène ABCB1.

Elle se fait exactement dans les mêmes conditions et de la même façon que

L'électrophorèse effectuée pour le contrôle des produits de la PCR durant 45 min. Le gel est visualisé par transillumination aux UV.



**Figure 9** : Photographie du gel après migration des fragments de digestion

### 3.4. Etude statistique analytique

Cette étude vise, d'avoir l'influence du polymorphisme G2677A/T de l'exon 22 du gène ABCB1 dans la survenu de la maladie de Crohn.

L'étude statistique est basée sur l'OR et la p-value dans le but de déterminer s'il existe une association significative entre les polymorphismes étudiés et la maladie de Crohn. Les calculs ont été faits en utilisant le logiciel *EPI-info* 5.01b

- **Le calcul de l'Odds Ratio :**

Pour le calcul de l'OR nous avons établi un tableau de contingence. Il est présenté sous forme de tableau croisé 2\*2. Le statut malade/non malade des sujets de l'étude est présenté en colonne et le caractère exposé/non exposé en ligne. L'IC est de 95%(ou 0.95).

**Tableau 5 : Tableau de contingence**

	Malade	Témoins
Exposé	a	b
Non exposé	c	d

L'OR est calculé comme suit : **OR = a\*b/c\*d**

- **Le choix de la « p-value » :**

Pour la valeur  $p$ , le seuil critique à priori est de 0.05 (vu que l'IC pour l'OR est de 95%). Si la valeur de  $p$  calculée à posteriori est inférieure à ce seuil, la différence entre les paramètres est déclarée statistiquement.



# *Résultats*

Les fréquences alléliques des différents allèles G et T ainsi que les fréquences génotypiques, les homozygotes G/G, des hétérozygotes G/T et des homozygotes T/T chez les deux populations témoins et malades ont été calculées.

## 1. Dans la population témoin

Nous avons recruté 15 individus comme témoins pour cette étude. Les résultats obtenus pour la population des témoins sont représentés dans le tableau.

**Tableau 6 :** Fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme G2677T du gène ABCB1 dans la population témoins

Gène et polymorphisme	Génotypes	Nombre (%)	Fréquences alléliques
ABCB1 G2677T	GG	8 (53.33)	F (G) = 0.7 (2.33%)
	GT	5 (33.33)	
	TT	2 (13.33)	F (T) = 0.3 (1%)

Après avoir calculé les fréquences génotypiques, nous avons noté une prédominance de la fréquence des génotypes (GG) avec un taux de 53.33% par contre les homozygotes mutée (TT) représentent le taux le plus faible par un pourcentage de 13.33%, les hétérozygotes (GT) dont intermédiaire par un taux de 33.33%. L'allèle G est prédominant dans cet échantillon.

## 2. Dans la population des patients

Cette étude inclus des patients diagnostiqués d'une MC. Les résultats du génotypage sont mentionnés dans le tableau 7

**Tableau 7** : Fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme G2677T du gène ABCB1 dans la population des patients

Gène et polymorphisme	Génotypes	Nombre (%)	Fréquences alléliques
ABCB1 G2677T	GG	4 (57.14)	F (G) = 0.78 (5.57%)
	GT	3 (42.85)	
	TT	0	F (T) = 0.21 (1.5 %)

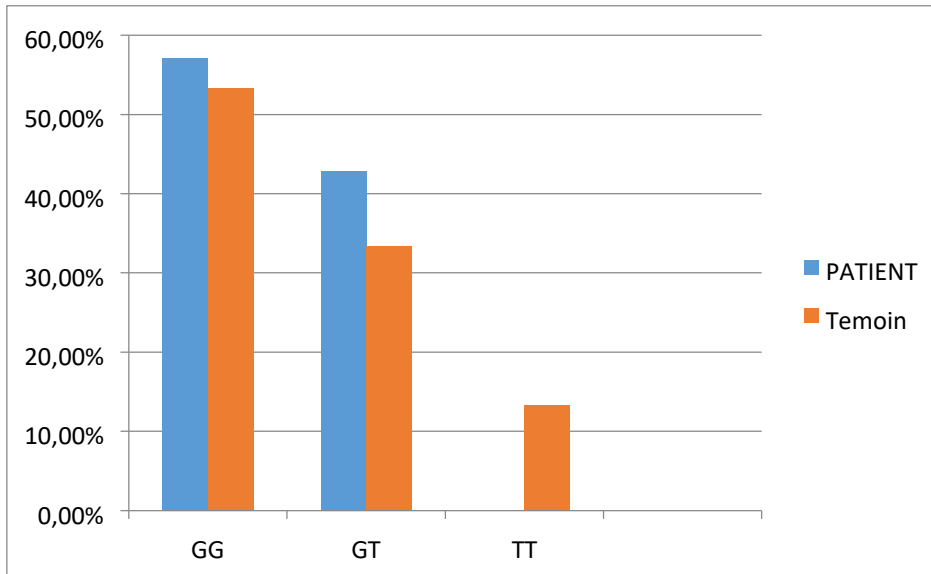
Dans la population des patients, les homozygotes normaux (GG) représentent le pourcentage le plus élevé avec un taux de 57.14%, les hétérozygotes (GT) représentent un taux de 42.5%. Nous n'avons trouvé aucun homozygote (TT) dans notre population de patients.

En calculant les fréquences alléliques, nous avons remarqué que la fréquence de l'allèle G est plus élevée avec un taux de 5.57% contre un taux de 1.5% pour l'allèle T

### 3. La comparaison entre les deux populations témoins et patients

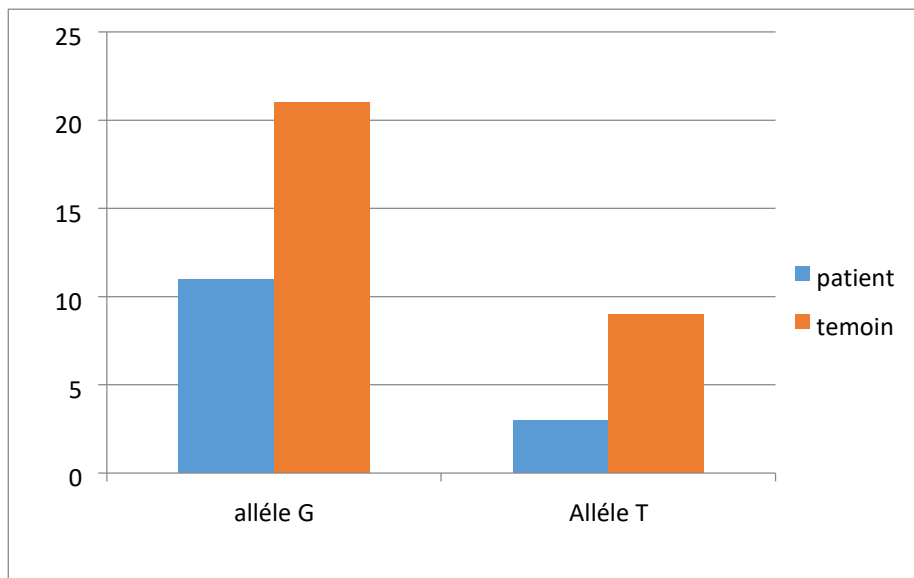
La comparaison entre les fréquences génotypiques montre qu'il n'y a pas une différence de répartition entre les deux groupes témoins et patients et ceci concernant les homozygotes GG et les hétérozygotes GT qui représentent des taux relativement proches avec une prédominance du génotype sauvage.

Cependant, le génotype TT est totalement absent dans la population de patients ce qui n'est pas le cas dans population des témoins.



**Figure 10 :** Comparaison des fréquences génotypiques du polymorphisme G2677T du gène ABCB1 entre la population des témoins et la population des patients

Concernant les fréquences alléliques, la distribution est homogène dans les deux échantillons avec une prédominance de l'allèle G qui représente un pourcentage de 70% dans la population témoins contre 78% chez les patients. La fréquence de l'allèle T est elle aussi équiprobable et (30% dans la population témoins et 21% dans la population des patients).



**Figure 11 :** Comparaison des fréquences alléliques du polymorphisme G2677T du gène ABCB1 entre les témoins et les patients

**Tableau 8 :** Comparaison statistique entre les fréquences génotypiques et alléliques des populations témoins et patients

G2677T/A Génotype	Patientes		Témoins		OR	p value
	n	%	n	%		
GG	4		8			
GT	3		5		0.83	<b>0.84</b>
TT	0		2		-	0.33
<b>TOTAL</b>						
Allèle G	11		21			
Allèle T	3		9		1.57	0.55

Après le calcul des Odds ratio et *P value*, les résultats observés lors de l'étude de l'association entre le génotype GG et le génotype (GT) ne montre aucune association significative (OR= 0.83 et p= 0.84, p=0.33) ce qui exclut le génotype GT comme un facteur de risque pour la survenue de la MC.

Nous n'avons pas pu établir la signification statistique entre CC vs TT à cause de l'effectif nul chez la population de patients.

Dans un même contexte, le résultat de l'étude de la relation entre les deux allèles sauvage et muté ne montre aucune significativité.

# *Discusión*

La MC est caractérisée par une réponse immunitaire à médiation cellulaire contre les bactéries lumineales. Il est suggéré que les niveaux d'expression de la P-gp, codée par le gène MDR1, sont importants pour la protection de l'intestin contre les xénobiotiques et les toxines bactériennes. Par conséquent, on pense que les mutations du gène MDR1 sont liées à la pathogenèse de la MC.

Notre étude est une étude de type cas témoins dont l'objectif a été de caractériser le polymorphisme G2677T du gène ABCB1 et d'étudier la présence d'une éventuelle implication dans la prédisposition à la MC.

Au cours de notre travail, on a pu mettre en place l'analyse par PCR-RFLP du polymorphisme G2677T du gène candidat.

Dans cette étude, le polymorphisme G2677T observé dans le gène MDR1 ne s'est pas avéré être un facteur de risque de la MC.

La contribution du gène ABCB1 à la susceptibilité génétique à la MC n'a pas été largement étudiée. Très peu de travaux épidémiologiques moléculaires ont été menées pour évaluer l'association entre le polymorphisme G2677T et le risque de la MC dans diverses populations. Cependant, les résultats restent contradictoires plutôt que concluants. La raison de cette variabilité des résultats dans la littérature n'est pas claire. Cependant, l'hétérogénéité ethnique de la population et/ou la variabilité de l'exposition aux facteurs environnementaux entre les populations pourraient être des explications plausibles.

Nos résultats sont cohérents avec une étude faite en Turquie sur un total de 35 patients atteints de la MC et un groupe témoin sain de 70 volontaires ont été génotypés pour le polymorphisme triallélique de G2677T/A dans le gène MDR1. Les distributions de génotypes des variantes G2677T/A se sont avérées similaires dans les groupes de patients et de contrôle et la différence n'était pas statistiquement significative. (Ayşegül *et al.*, 2008).

Une autre recherche menée sur les gènes de transport SLC dans un échantillon chinois n'a trouvé aucune association avec la MC. (Feng *et al.*, 2015)

Cependant, nos résultats sont en contradictions avec d'autres travaux publiés dans la population algérienne, Le gène multi-médicaments (MDR1) a suscité un intérêt croissant comme un gène de susceptibilité de la MC. La fréquence du polymorphisme G2677A/T était significativement plus élevée que chez les témoins (allèle T : 42,5 vs 25 % ; allèle A :

2,12 vs 0,5 % ;  $P = 0,0012$  ;  $OR = 2,360$  ; (IC) 95 % = 1,408–3,955). Les porteurs homozygotes et hétérozygotes de l'allèle muté 2677T sont significativement plus fréquents ( $P = 0,0022$ ) dans le groupe des cas (17,02 et 51,06 % respectivement) par rapport aux témoins (3 et 43 % respectivement) ce qui n'est pas le cas dans notre échantillon. (**Bouzidi et al., 2016**).

Dans une population canadienne, portant sur des études fonctionnelles et qui trouvaient que le polymorphisme G2677T/A a montré des associations incohérentes avec la MC. Leur échantillon représentait au total de 270 cas de MC et 336 témoins. L'analyse des associations alléliques a révélé que le SNP G2677T était significativement associé à la susceptibilité globale à la MC ( $p = 0,04$ ) (**Krupoves et al. 2008**).

Des études antérieures portant sur l'influence du polymorphisme codant G2677A/T sur l'expression de l'ARNm et de la P-gp170 ont atteint des résultats contradictoires. Kim et al. Ont rapporté une association de l'allèle 2677T avec des niveaux plus élevés d'expression de P-gp170 (**Kim et al., 2001**)

Cependant, Kimchi-Sarfaty et ces collaborateurs n'ont documenté aucune influence de ce polymorphisme sur le niveau d'expression et la localisation intracellulaire de P-gp170 (**Kimchi et al., 2007**)



# *Conclusion*

L'étiologie de la MC implique des facteurs environnementaux et génétiques qui conduisent à un dysfonctionnement de la barrière épithéliale avec pour conséquence une dérégulation du système immunitaire muqueux et des réponses au microbiote intestinal.

Le rôle putatif de la P-gp dans le tractus gastro-intestinal est de diminuer l'absorption des toxines amphipathiques hydrophobes endogènes et exogènes. Malgré les études *in vivo* et *in vitro*, les preuves épidémiologiques sur les associations du gène ABCB1 codant la P-gp avec la MC sont largement incohérentes.

Dans ce travail nous avons cherché l'existence d'une éventuelle relation entre le polymorphisme G2677T du gène ABCB1 sur la survenue de la MC.

Les résultats de notre travail ont montré qu'il n'y a pas association significative entre de polymorphisme G2677T/A et l'apparition de la MC.

Il est noté que le temps réservé à la réalisation pratique du travail et les difficultés rencontrés nous ont devancés la poursuite du travail. Toutefois, ces résultats ne peuvent pas être confirmatifs vu le faible nombre de notre échantillon qui reste insuffisant pour une conclusion définitive. Il est donc essentiel d'élargir la population d'étude.

À ce jour, aucune méta-analyse portant sur l'association du gène ABCB1 avec la MC n'a été réalisée. En perspective, une méta-analyse, incluant plusieurs résultats serait intéressante dans afin de cumuler et synthétiser l'apport du ABCB1 dans la contribution génétique chez les patients atteints de MC. De plus, plus loin des études fonctionnelles sont nécessaires pour déterminer si ce SNP a un impact sur la susceptibilité à la MC.

*Références  
bibliographique*

## A

**Abraham C, M.D, Judy HC, M.D.** *N Engl J Med.* 2009.

**Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, Stange EF.** Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014.

**Adami S, Davide G.** Coxibs: a significant therapeutic opportunity. *Acta Biomed.* 2010.

**Andreoli GM, Roggini M, Pepino D, Avanzo M D, , Ceccanti S, Capocaccia P.** Respiratory distress in newborn. *Evaluation of chest X-rays Minerva Pediatr.* 2010.

**Azzaria M, Schurr E, Gros P.** Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol Cell Biol.* 1989.

**Amanda CF, Leisa LA, Gustavo JL, Adriana Y, Carmen SP, Luis OS, SD, Deanna LK, Priscila GM.** GSTP1 and ABCB1 Polymorphisms Predicting Toxicities and Clinical Management on Carboplatin and Paclitaxel-Based Chemotherapy in Ovarian Cancer. *Clinical and Translational Science.* 2020.

**Alfreda K, Ernest GS, David M, David I, Kenneth M, Philippe L, Irina C, Colette D, Guy G, Liliane L, Emile L, Devendra KA.** Associations Between ABCB1/MDR1 Gene Polymorphisms and Crohn's Disease: A Gene-wide Study in a Pediatric Population. *Inflammatory Bowel Diseases.* 2009.

**Asa H, Goran M,** Gut Microbiota and Inflammation. *Nutrients.* 2011.

## B

**Baumgart DC, Sandborn WJ.** Crohn's disease. *Lancet.* 2012.

**Bodor M, Kelly EJ, Ho RJ.** Characterization of the human MDR1 gene. *Aaps J.* 2005.

**Baumgart, D. C. et W. J. Sandborn.** «Crohn's disease». *Lancet.* 2012.

**Bardou M.** Appendicectomies et maladie de Crohn, la fin d'un mythe ?. *journal international de médecine*. 2007.

**Bergmann, TK, Gréen, H., Brasch-Andersen, C. et al.** Retrospective study of the impact of pharmacogenetic variants on paclitaxel toxicity and survival in patients with ovarian cancer. *Eur J Clin Pharmacol*. 2011.

**Barreau F, Chrystèle M , Ulrich M, Dominique B, Monique D, Françoise M, Lars E, Mickael K, Ghislaine S, Stéphane B, Thécia , Jean-Pierre H.** Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches. *Gut*. 2010.

**Boirivant et Cossu.** Inflammatory bowel disease. 2012.

**Bernstein CN et al, Bernstein CN, Loftus EV Jr, Ng SC, Lakatos PL, Moum B.** Epidemiology and Natural History Task Force of the International Organization for the Study of Inflammatory Bowel Disease (IOIBD). Hospitalisations and surgery in Crohn's disease. *Gut*. 2012.

**Binkhathlan Z, Afsaneh L.** P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer, status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets*. 2013.

**Borgnia MJ, Eytan GD, Assaraf YG.** Competition of hydrophobic peptides, cytotoxic drugs, and chemosensitizers on a common P-glycoprotein pharmacophore as revealed by its ATPase activity. *J Biol Chem*. 1996.

**Brinar M, Cukovic-Cavka S, Bozina N, Ravic KG, Markos P, Ladic A, Cota M, Krznaric Z, Vucelic B.** BMC MDR1 polymorphisms are associated with inflammatory bowel disease in a cohort of Croatian IBD patients. *Gastroenterol*. 2013.

## **C**

**Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P et al.** *Gastroenterology*. 2007.

**Cortot AG, Vernier MG.** Implication physiopathologique. In : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : maladies génétiques ou de l'environnement ? Paris : Elsevier Masson SAS. 2009.

**Cosnes J, Seksik P.** Facteurs environnementaux dans la maladie de Crohn. *In: Acta Endoscopica.* 2006.

**Craven M, Egan CE, Dowd SE, McDonough SP, Dogan B, Denkers EY, Bowman D, Scherl EJ, Simpson KW.** Inflammation drives dysbiosis and bacterial invasion in murine models of ileal Crohn's disease. *PLoS One.* 2012.

## **D**

**Dima AF, Abdullah Saad AA, Ghadah AB; Homoud AA, Khalid AH, Ahmad MS, Tahani AK, Anhar AA.** Crohn's Disease: Pathophysiology, and Management. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine.* 2018.

## **E**

**Edouard LP.** Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Doin Editions .*2010.

**Elise J, Gérard S, Bérange B, Laetitia A, Charalampos A, Gerd S, Sophie VS,** Association of ABCB1 gene polymorphisms with plasma lipid and apolipoprotein concentrations in the STANISLAS cohort. *Clinica Chimica Acta.* 2009.

## **F**

**Franke A, McGovern DP, Barrett JC, et al.** Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010.

**Famularo G, Minisola G, Laura G.** Comment and reply on: Atorvastatin: safety and tolerability. Statins and polymyositis: aneglected link? *Expert Opin Drug Saf.* 2010.

**Frances JS, Sharom J.** Shedding light on drug transport : structure and function of the Pglycoprotein multidrug transporter (ABCB1). *Biochemistry and Cell Biology.*

## **G**

**Ginsburg, Oppenheimer et Berg MS.** Hospital (New York). Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD, Regional ileitis, a pathologic and clinical entity. *JAMA.* 1932.

## **H**

**Hamidovic, A, Hahn, K & Kolesar, J.** Clinical significance of ABCB1 genotyping in oncology. *J. Oncol. Pharm. Pract.* 2010.

**Huttenhower C, Kostic AD, Xavier RJ.** Inflammatory bowel disease as a model for translating the microbiome. *Immunity*. 2014.

**Hwang JU, Song WY, Hong D, Ko D, Yamaoka Y, Jang S, Yim S, Lee E, Khare D, Kim K, et al.** Plant ABC transporters enable many unique aspects of a terrestrial plant's lifestyle. *Mol Plant* 2016.

**Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O et al.** Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000.

## **J**

**Janowitz H D,** Burrill B. Crohn (1884-1983). *Mt Sinai J Med*. 2000.

**Jonathan M.** Crohn Disease: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Radiol Technol*. January/February 2014.

**Jean-Pierre H, Jérôme V.** Physiopathologie de la maladie de Crohn : l'indispensable pour le clinicien. POST'U. *Association Française de Formation Médicale Continue en HépatogastroEntérologie*. 2015.

**Jantchou P, Monnet E, Carbonnel F.** Les facteurs environnementaux dans la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (tabac et appendicectomie exclue). *In : Gastroentérologie Clinique et Biologique*. 2006.

## **K**

**Khosravi M, Khalaj Z, Nouri N, Najafu M., Mehrzad V, Forat-Yazdi M, Mokarian F, Salehi M.** Lack of Association between C1236T, G2677T/A and C3435T Variants of the ABCB1 Gene and Imatinib Response in Iranian Chronic Myeloid Leukemia Patients. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*. 2021.

**Kamada N, Sang-Uk S, Grace YC, Gabriel N.** Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. 2013.

**Kökten T, Hansmannel FF, Melhem H et al.** Physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). *Aln.editions. Hegel*. 2016.

**Klement E, Cohen R-V, Boxman J, Joseph A, Reif S.** Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis . *Am J Clin Nutr.* 2004.

**Kimberley W. J. Van DS, Amit DJ, Danielle RB, Katherine KG, Kathleen OS, Paul L, MBChB, John JG, Cosmas G, Vijay Y, Ashwin NA, Behrooz ZA, Ramnik JX, Hamed K.** Visceral Adiposity, Genetic Susceptibility, and Risk of Complications among Individuals with Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases.* 2017.

**Khanna R, Nelson SA, Feagan BG, D'Haens G, Sandborn WJ, Zou G, et al.** Endoscopic scoring indices for evaluation of disease activity in Crohn's disease. *In: Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2016.

**Khosravi, M., Khalaj, Z., Nouri, N., Najafu, M., Mehrzad, V., Forat-Yazdi, M., Mokarian, F., Salehi, M.** Lack of Association between C1236T, G2677T/A and C3435T Variants of the ABCB1 Gene and Imatinib Response in Iranian Chronic Myeloid Leukemia Patients. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran.* 2021.

**Kim Y, Chen J.** Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound. *outwardfacing conformation. Science.* 2018.

**Loftus, EV, JR.** Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology.* 2004.

## **L**

**Leila A, Benoit C, Emilie T, Claire L, Julia D, Pierre H, Vincianne M, Jean-Marc M, Michael S, Jean-Michel G, Pierre C, Mehdi T, Marc A, Yukihide M, Valerie D, François C, Myriam M, Latifa K, Nadine C, Sandra O, Alessandro Z, Charlotte M, Jacques D, Jean-Pierre H, Martine D, Edouard L, Severine V, Andre VG, Wouter C, Jean-Claude T, Michel G, Denis F,** Analysis of Genes Associated With Monogenic Primary Immunodeficiency Identifies Rare Variants in XIAP in Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology.* 2018.

**Loren R, Stacey WM, Amanda C, Jeremy B, Mario M, Andrew T, Sema M, Douglas S, Amy L, Maria-LT, Kathleen T, Kevin S, Allen E, Elizabeth K, Londell MG, Lucia P, Mysheika LW, Naomi T, Radhika I, Thomas AC, Mary D.** *Clinical Infectious Diseases.* 2013.



## M

**Molodecky N.A. Soon I.S. Rabi D.M. et al.** Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012.

**Mijac D, Vukovic-PI, Mijac V, Perovic V, Milic N, Djuranovic S, et al.** MDR1 gene polymorphisms are associated with ulcerative colitis in a cohort of Serbian patients with inflammatory bowel disease. 2018.

**Manichanh C, L Rigottier.Gois, E Bonnaud, K Gloux, E Pelletier, L Frangeul, R Nalin, C Jarrin, P Chardon, P Marteau, J Roca, and J Dore.** Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. 2006.

**Mark DD, Arthur ML, Kirabo H, Jin L, Meena T, Lindsay MG, Robert NB, Lee AD, Babette SZ, Michelle RD, Rita H, Mary BL.** Increases in IGF-1 After Anti-TNF- $\alpha$  Therapy Are Associated With Bone and Muscle Accrual in Pediatric Crohn Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2018.

**Minko, T, Rodríguez R, Lorna, Pozharov, Vitaly..** Nanotechnology approaches for personalized treatment of multidrug resistant. *Cancers Advanced drug delivery reviews*. 2013.

**Manna J, Sanjeev VT.** Role of multidrug transporters in neurotherapeutics. *Annals of Indian Academy of Neurology*. 2009.

## N

**Ng SC, Bernstein CN, Vatn MH, Lakatos PL, Loftus EV Jr, Tysk C, O'Morain C, Moum B, Colombel JF.** Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. Epidemiology and Natural History Task Force of the International Organization of Inflammatory Bowel Disease (IOIBD). *Gut*. 2013.

**Nos P, Domènech E.** Management of Crohn's disease in smokers: Is an alternative approach necessary? *World J Gastroenterol WJ*. 2011.

**Neurath MF.** Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2014.

## O

**Oostenbrug LE, Dijkstra G, Nolte IM, et al.** Absence of association between the multidrug resistance (MDR1) gene and inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2006.

## **P**

**Peyrin BL, Loftus EV Jr, Colombel JF, Sandborn WJ Am J.** The natural history of adult Crohn's disease in population-based cohorts. *Gastroenterol.* 2010.

**Pescatori M, Interisano A, Basso L.** Management of perianal Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 1995.

## **Q**

**Qin, X.** «Etiology of inflammatory bowel disease : A unified hypothesis.». *World Journal of Gastroenterology.* 2012.

## **R**

**Rahimi R, Nikfar S, Rezaie A, Abdollahi M.** A meta-analysis of broad-spectrum antibiotic therapy in patients with active Crohn's disease. *Clin Ther.* 2006.

**Rowe W.A., Lichtenstein G.R.** Inflammatory bowel diseases. 2012.

**Rioux, J., Xavier, R., Taylor, K. et al.** Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet.* 2007.

**Rothenberg ML, Mickley LA, Cole DE, et al.** Expression of the mdr 1 /P-170 gene in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1989.

**Roby WV, Susana R, Fernando AM, Luciana MR, Stéphanie VP, Luciana CB, Carmen SL, Carmen SB.** ABCB1 variants (C1236T, rs1128503 and G2677T/A, rs2032582) do not show an association with recurrence and survival in patients with breast cancer undergoing anthracycline-based chemotherapy, *Meta Gene.* 2019.

## **S**

**Satimai A, Sang HP, Edward VL Jr.** Epidemiology, Natural History, and Risk Stratification of Crohn's Disease. 2017.

**Shah, A, Talley N.J, Walker M, et al.** Is There a Link Between H. Pylori and the Epidemiology of Crohn's Disease?. *Dig Dis Sci.* 2017.

**Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I.** Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*. 1993.

**Sào P.** ABCD.arq.bras.cir.dig.Nov. 2013.

**Simone V, Ronchetti G, Franzè E, Colantoni A, Ortenzi A, Fantini MC, et al.** Interleukin-21 sustains inflammatory signals that contribute to sporadic colon tumorigenesis. *Oncotarget*. 2015.

## T

**Thia, KT, Sandborn WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR et Edward VL Jr.** Risk factors associated with progression to intestinal complications of crohn's disease in a population based cohort». *Gastroenterology*. 2010.

**Tang K, Ngoi SM, Gwee PC, Chua JM, Lee EJ, Chong SS and Lee CG.** Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations. *Pharmacogenetics*. 2002.

## V

**Vivaldi C, Crucitta S, Catanese S et al.** Comprehensive pharmacogenetic analysis of DPYD, UGT, CDA, and ABCB1 polymorphisms in pancreatic cancer patients receiving mFOLFIRINOX or gemcitabine plus nab-paclitaxel. *Pharmacogenomics*. 2021.

**Vasilopoulos Y, Sarri C, Zafiriou E, et al.** A pharmacogenetic study of ABCB1 polymorphisms and cyclosporine treatment response in patients with psoriasis in the Greek population. *Pharmacogenomics*. 2014.

**Verhalen B, Dastvan R, Thangapandian S, Peskova Y, Koteiche HA, Nakamoto RK, Tajkhorshid E, McHaourab HS.** Energy transduction and alternating access of the mammalian ABC transporter P-glycoprotein. *Nature*. 2017.

## W

**Wills JS, Lobis IF, Denstman FJ.** Crohn disease. *State of the art. Radiology*. 1997.

**Wallace KL.** Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014.

**Ward AB, Szewczyk P, Grimard V, Lee C-W, Martinez L, Doshi R, et al.** Structures of Pglycoprotein reveal its conformational flexibility and an epitope on the nucleotide-binding domain. *Proc Natl Acad Sci.* 2013.

## **Y**

**Yakusheva EN, Titov DS.** Structure and Function of Multidrug Resistance Protein 1. *Biochemistry Moscow.* 2018.

**Yang QF, Yu-WL, Pei YZ, Chang LX, Xing LC, ChengYL.** Elevated serum levels of soluble Axl in acute coronary syndrome. *Am J Med Sci.* 2015.

## **Z**

**Zhang YX, Wei SJ, Yang XY, Zhang WP, Wang XY, Dang HW.** Effects of genetic polymorphisms of CYP2C19\*2/\*3 and MDR1 C3435T on the pharmacokinetics of lansoprazole in healthy Chinese subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2014.

**Zawadzka I, Jeleń A, Pietrzak J, et al.** The impact of ABCB1 gene polymorphism and its expression on non-small-cell lung cancer development, progression and therapy – preliminary report. *Sci Rep.* 2020.

# *Annexes*

Annexe : 1

FICHE DE RECUEIL D'INFORMATION/ TEMOIN (FEMME)

CARACTÉRISTIQUES SOCIO-DÉMOGRAPHIQUES

Nom : .....

Prénom : .....

Date/lieu de naissance : .....

Lieu d'habitat : Urbain  Rural

Etat civil : célibataire  mariée  divorcée  veuve

Enfants : OUI  NON  Si oui, préciser le nb d'enfants (inclure les enfants décédés) : .....

Niveau d'étude : analphabète  primaire  moyen  secondaire  supérieur

Profession : active  retraitée  femme au foyer  étudiante

Si active ou retraitée, préciser l'activité principale : .....

CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES

Poids actuel : ..... Kg

Taille actuelle : ..... Cm

MODE DE VIE

Consommation du tabac :

Fumeuse : OUI  NON  Si Oui, .....paquet/j, depuis .....ans

Ancienne fumeuse : OUI  NON  Si Oui, .....paquet/j, durée .....ans

Consommatrice du tabac à chiquer : OUI  NON  Si Oui, préciser, ..... fois/j, depuis .....ans

Ancienne consommatrice du tabac à chiquer : OUI  NON  Si Oui, préciser, ..... fois/j, durée .....ans

Consommation d'alcool :

Actuellement : OUI  NON  Si Oui, préciser, ...fois/mois, depuis .....ans

Au passé : OUI  NON  Si Oui, préciser, ...fois/mois, durée .....ans

Consommation de caféine : OUI  NON  Si Oui, préciser, ...tasse/j

Exposition à certains produits : OUI  NON

Si OUI, préciser : pesticides  herbicides  métaux lourds  produits chimiques

Préciser la durée

RENSEIGNEMENTS CLINIQUES SUPPLEMENTAIRES

Age de la ménarche : .....ans

Cycle menstruel : régulier  irrégulier

Nb de grossesses normales :

Nb de grossesses arrêtées :

Pas de grossesses :

Nb de fausses couches spontanées :

Prise de contraception

durée

ANTECEDENTS MEDICAUX FAMILIAUX : OUI  NON

Si Oui, préciser : .....

.....

FICHE DE RECUEIL D'INFORMATION / TEMOIN (HOMME)

CARACTÉRISTIQUES SOCIO-DÉMOGRAPHIQUES

Nom :.....  
Prénom :.....  
Date/lieu de naissance :.....  
Lieu d'habitat : Urbain  Rural   
Etat civil : célibataire  marié  divorcé  veuf   
Enfants : OUI  NON  Si oui, préciser le nb d'enfants (inclure les enfants décédés) :...  
Niveau d'étude : analphabète  primaire  moyen  secondaire  supérieur   
Profession : actif  retraité  chômeur  étudiant   
Si actif ou retraité, préciser l'activité principale : .....

CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES

Poids actuel : ..... Kg                      Taille: ..... Cm

MODE DE VIE

Consommation du tabac :  
Fumeur : OUI  NON  Si Oui,.....paquet/j, depuis.....ans  
Ancien fumeur : OUI  NON  Si Oui,.....paquet/j, durée.....ans  
Consommateur du tabac à chiquer : OUI  NON  Si Oui, préciser, ..... fois/j, depuis.....ans  
Ancien consommateur du tabac à chiquer : OUI  NON  Si Oui, préciser, ..... fois/j, durée.....ans  
Consommation d'alcool :  
Actuellement : OUI  NON  Si Oui, préciser, ...fois/mois, depuis.....ans  
Au passé : OUI  NON  Si Oui, préciser, ...fois/mois, durée.....ans  
Consommation de caféine : OUI  NON  Si Oui, préciser, ...tasse/j  
Exposition à certains produits : OUI  NON   
Si OUI, préciser : pesticides  herbicides  métaux lourds  produits chimiques   
Durée de l'exposition : ..... ans

ANTECEDENTS MEDICAUX FAMILIAUX : OUI  NON   
Si Oui, préciser : .....  
.....

Annexe : 3

Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire

Chef de laboratoire : Pr D.SATTA

## Formulaire de consentement pour étude génétique

Je soussigné(e) : Nom ..... Prénom .....

Certifie avoir été pleinement informé(e) par le : .....

1. Des raisons et des conditions de l'étude génétique me concernant
  2. Du caractère strictement confidentiel des résultats qui seront obtenus
  3. Que ces études se limiteront à la recherche d'une anomalie génétique dans le cadre du cancer du sein
  4. Que ces études seront réalisées par un laboratoire spécialisé et agréé
  5. Que je pourrais avoir connaissance par mon médecin traitant des résultats ainsi que toute information confidentielle me concernant
- **Donne mon accord pour l'enregistrement des données médicales nécessaires à ces études**
  - **Accepte que le prélèvement puisse être utilisé pour ces examens.**

Fait à : .....

Le : .....

Signature du patient

Nom et signature du responsable de prélèvement

Cachet du laboratoire



## Annexe : 4

### ABCB1 EXON 22 (G2677T/A)

ctgaagtcacatggaaattcttactgtagaaactcaataaacttacaagtagacctttactttttagttc  
attactgataaaataatgaatatagtctcatgaaggtgagttttcagaaaatagaagcatgagttgtg  
aagataatattttttaaatttctcctaatttgttttggttttgagGCTATAGGTTCCAGGCTTGCTGTA  
ATTACCCAGAATATAGCAAATCTTGGGACAGGAATAATTATATCCTTCATCTATGGTTGGCAACTAAC  
ACTGTTACTCTTAGCAATTGTACCCATCATTGCAATAGCAGGAGTTGTTGAAATGAAAATGTTGTCTG  
GACAAGCACTGAAAGATAAGAAAGAACTAGAAGGTTCTGGGAAGgtgagtcaaactaaatagattga  
ttaattaagtagagtaaagtattcctaatcagtggtttttgttactcctactgcttactatgctcta  
agaatggtttataaccattcctcaaagcaatcttttcatgcttattcagtaaattagaaacttaca  
gaaagtagcaaagccagttc

## Annexe : 5

Les préparations des solutions de l'extraction :

- **TE 10/1** : (tris 10mM, EDTA 1Mm, pH7.4) auto clavé  
Tris : 0.606g.  
EDTA : 0.1869g pour 500 ml.  
Ajuster le pH avec de l'HCL 1N.
- **Tampon de lyse** : NaCl 400 Mm  
Tris : 10 mM.  
EDTA : 2 mM.  
pH8.2
- **SDS 10%**
- **Protéinase K** : 10mg /ml H<sub>2</sub>O
- **NaCl 4M**
- **Ethanol absolu**
- **Ethanol 70%**
- **Bleu de Bromophénol (BBP)** :  
BBP20mg  
Tris 0.5M :2ml  
Glycérol : 5ml  
pH7.5  
H<sub>2</sub>O 10ml
- **TBE 10X** :  
Tris 108g.  
Acide borique 55 g.  
Ajuster le pH à 8.3 avec l'acide acétique glacial.  
EDTA 9.3g.  
H<sub>2</sub>O 1L.

# *Résumé*

## Résumé

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire de l'intestin caractérisé par une inflammation chronique du tube digestif.

Le gène ABCB1 est l'un des nombreux gènes omniprésents de la cassette de liaison à l'adénosine triphosphate (ATP) codant une P-glycoprotéine (p-gp). Il a été démontré que la réduction de la fonction et de l'expression de la P-gp est associée à des troubles inflammatoires de l'intestin. Le polymorphisme G2677T dans l'exon 21 du gène, conduit à une diminution de l'activité de la p-gp, semblait prédisposer au développement d'une MC.

Dans deux populations différentes (témoins et patient), nous avons essayé de chercher une association entre le polymorphisme G2677T du gène ABCB1 et la MC, la recherche du polymorphisme était par la méthode de PCR-RFLP.

Nous avons observé que la distribution des fréquences génotypiques et alléliques est relativement proche dans les deux populations. Cependant, les résultats trouvés lors de l'étude statistique ne montre aucune association significative entre le polymorphisme G2677T du gène ABCB1 et la MC ce qui l'exclut comme un facteur de risque pour la survenue de la MC.

## **Abstract**

Crohn's disease (CD) is an inflammatory bowel disease characterized by chronic inflammation of the digestive tract.

The ABCB1 gene is one of several ubiquitous adenosine triphosphate (ATP) binding cassette genes encoding a P-glycoprotein (p-gp). Reduced P-gp function and expression has been shown to be associated with inflammatory bowel disorders. The G2677T polymorphism in exon 21 of the gene, leading to a decrease in p-gp activity, appeared to predispose to the development of CD.

In two different populations (control and patient), we tried to look for an association between the G2677T polymorphism of the ABCB1 gene and CD, the search for the polymorphism was by the PCR-RFLP method.

We noticed that the distribution of genotypic and allelic frequencies is relatively close in both populations. However, the results found in the statistical study showed no significant association between the G2677T polymorphism of the ABCB1 gene and CD, which excludes it as a risk factor for the occurrence of CD.

## ملخص

داء كرون (CD) هو مرض التهاب الأمعاء يتميز بالتهاب مزمن في الجهاز الهضمي

الجين ABCB1 هو واحد من عدة جينات ملزمة للأدينوزين ثلاثي الفوسفات في كل مكان تقوم بتشفير البروتين السكري

ثبت أن انخفاض وظيفة البروتين السكري و التعبير المرتبط باضطرابات الأمعاء الإلتهابية

يبدو أن تعدد الأشكال G2677TT/A في EXON21 من الجين مما يؤدي إلى انخفاض نشاط البروتين السكري , يؤهب لتطوير داء كرون في مجموعتين مختلفتين حاولنا البحث عن الارتباط بين تعدد الأشكال G2677T/A للجين ABCB1 و داء كرون.

كان البحث عن تعدد الأشكال بواسطة تقنية PCR-RFLP لاحظنا أن توزيع ترددات النمط الجيني و الأليلي قريب نسبيا في كلا المجموعتين. و مع ذلك, أظهرت النتائج التي تم العثور عليها في الدراسة الإحصائية عدم وجود ارتباط كبير بين تعدد الأشكال G2677T / للجين ABCB1 و داء كرون , مما يستبعده كعامل خطر لداء كرون.

Année universitaire : 2020 - 2021

Présenté par : BARKAT Djouhaina  
HARIECHE Meriem

## Implication du polymorphisme G2677A du gène ABCB1 dans la maladie du Crohn

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique

### Résumé

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire de l'intestin caractérisé par une inflammation chronique du tube digestif.

Le gène ABCB1 est l'un des nombreux gènes omniprésents de la cassette de liaison à l'adénosine triphosphate (ATP) codant une P-glycoprotéine (p-gp). Il a été démontré que la réduction de la fonction et de l'expression de la P-gp est associée à des troubles inflammatoires de l'intestin. Le polymorphisme G2677T dans l'exon 21 du gène, conduit à une diminution de l'activité de la p-gp, semblait prédisposer au développement d'une MC.

Dans deux populations différentes (témoins et patient), nous avons essayé de chercher une association entre le polymorphisme G2677T du gène ABCB1 et la MC, la recherche du polymorphisme était par la méthode de PCR-RFLP.

Nous avons observé que la distribution des fréquences génotypiques et alléliques est relativement proche dans les deux populations. Cependant, les résultats trouvés lors de l'étude statistique ne montre aucune association significative entre le polymorphisme G2677T du gène ABCB1 et la MC ce qui l'exclut comme un facteur de risque pour la survenue de la MC.

Ces résultats restent à confirmer dans le futur, une analyse plus approfondie utilisant un plus grand groupe de patients et des études fonctionnelles seraient intéressantes pour élucider le rôle du gène ABCB1 dans la MC

**Mots-clefs :** la maladie de Crohn, le gène ABCB1, polymorphisme G2677T/A, PCR-RFLP

### Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

**Président du jury :** Pr SATTI Dallila (professeur - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

**Encadreur :** Dr SEDRATI Khadidja (MCB - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examinateur :** Dr DAOUI Zineb (MCB - Université de Batna).

