

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des frères Mentouri, Constantine 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 105/DS/2016

N° de série : 07/Bio A/2016

THÈSE

*Présentée pour l'obtention du diplôme de docteur en sciences
Option : Génétique des pathologies humaines*

Par

DAOUI ZINEB

THÈME :

*Etude moléculaire du gène
CARD15/NOD2 chez des patients
atteints de la maladie de Crohn*

Membres du Jury :

Président du Jury	Tebibel Souraya	Prof. Université des Frères Mentouri, Constantine 1
Directrice de thèse	Satta Dalila	Prof. Université des Frères Mentouri, Constantine 1
Examineurs	Abadi Noureddine	Prof. Université Constantine 3
	Hammada Talel	Prof. Université Constantine 3
	Belaaloui Ghania	M.C. Université Batna 2

Année universitaire: 2015 - 2016



قال عليه الصلاة والسلام: ((إن الله و ملائكته و أهل
السموات و الأرض حتى النملة في جحرها و حتى الحوت
في البحر ليصلون على معلمي الناس الخير)) .

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photographies

Introduction 1

Etude bibliographique

I	Aspect clinique et épidémiologique de la MC	3
1	Epidémiologie	3
1.1	Répartition mondiale de la MC	3
1.2	Impact socio-culturel	4
1.2.1	Age	4
1.2.2	Sexe	5
1.2.3	Ethnie	5
2	Anatomie, histologie et physiologie de tube digestif	5
2.1	L'œsophage	6
2.2	L'estomac	6
2.3	L'intestin grêle	6
2.4	Le gros intestin	7
3	Diagnostic	8
3.1	Manifestations cliniques	8
3.2	Diagnostic	9
3.2.1	Diagnostic différentiel	9
3.2.2	Exploration diagnostiques	10
3.2.2.1	Examens biologiques	10
3.2.2.2	Imagerie médicale	11
4	Classification de la MC	12

4.1	Classification de la MC en fonction de l'âge	13
4.2	Classification de la MC en fonction de la localisation	13
4.3	Classification de la MC en fonction de type	13
5	Traitement	15
6	Etiologies de la MC	16
6.1	Rôle du système immunitaire	16
6.1.1	La réponse immunitaire innée	17
6.1.2	La réponse immunitaire acquise	17
6.2	Facteurs environnementaux	18
6.2.1	Tabac	18
6.2.2	Habitudes alimentaires	19
6.2.3	Appendicectomie	19
6.2.4	Médicaments	20
6.2.5	Amélioration du niveau d'hygiène	20
6.2.6	Facteurs psychologiques	20
6.3	Facteurs infectieux	20
II	Génétique de la MC	21
1	Gène <i>CARD15/NOD2</i>	22
1.1	Structure du gène <i>CARD15/NOD2</i>	22
1.2	Ligand de la protéine <i>CARD15/NOD2</i>	23
1.3	Fonction de la protéine <i>CARD15/NOD2</i>	25
1.4	Spectre mutationnel dans la MC	27
1.5	Rôle du <i>CARD15/NOD2</i> dans la MC	29
1.6	Importance du génotype en pratique clinique	30
1.7	Implication de <i>CARD15/NOD2</i> dans d'autres maladies	31
2	Autres gènes candidats associés au développement de la MC	32
3	Pharmacogénétique	33

Méthodologie

I	Patients et témoins	35
1	Recrutement des patients	35

2	Recrutement des témoins	36
3	Prélèvement sanguin	36
II	Méthodes expérimentales	36
1	Extraction de l'ADN	36
1.1	Estimation qualitative d'ADN	37
1.2	Estimation quantitative d'ADN	37
2	Génotypage du gène <i>CARD15/NOD2</i>	38
2.1	Amplification par PCR	38
2.1.1	Réactifs utilisés pour la PCR	40
2.1.2	Protocole de la PCR	41
2.2	Contrôle des produits PCR	43
2.3	Digestion des produits PCR	42
2.4	Electrophorèse des produits de la digestion	43
3	Etude statistique analytique	43

Résultats et discussion

I	Caractéristiques principales des patients	
1	Age	45
2	Sex-ratio	46
3	Age et sex-ratio	47
4	Répartition géographique de nos patients	49
5	Statut tabagique	50
6	Antécédents familiaux	51
7	Aspect cliniques: résultats	52
7.1	Manifestations générales	52
7.2	Manifestations digestives	52
7.3	Manifestations extra-intestinales	52
8	Classification phénotypique	53
8.1	Age de début	53
8.2	Localisation anatomique de la maladie	53
8.2.1	En fonction de l'âge	54
8.2.2	En fonction du sexe	55

8.3	Intensité de la maladie	56
II	Résultats de l'analyse moléculaire du gène <i>CARD15/NOD2</i>	59
1	Polymorphisme R702W	59
1.1	Fréquences alléliques et génotypiques	59
1.2	Corrélation du R702W et l'âge de début de la maladie	61
1.3	Corrélation du R702W et localisation de la MC	62
1.4	Corrélation du polymorphisme R702W et intensité de la maladie	63
1.5	Corrélation du R702W et signes extra-digestifs	63
2	Polymorphisme G908R	64
2.1	Fréquences alléliques et génotypiques	64
2.2	Corrélation du G908R et l'âge de début de la maladie	67
2.3	Corrélation du G908R et localisation de la MC	67
2.4	Corrélation du polymorphisme G908R et intensité de la maladie	68
2.5	Corrélation du G908R et signes extra-digestifs	68
3	Polymorphisme 1007fs	69
3.1	Fréquences alléliques et génotypiques	69
3.2	Corrélation du 1007fs et l'âge de début de la maladie	72
3.3	Corrélation du 1007fs et localisation de la MC	72
3.4	Corrélation du polymorphisme 1007fs et intensité de la maladie	73
3.5	Corrélation du 1007fs et signes extra-digestifs	73
4	Susceptibilité de la présence d'un seul allèle muté et phénotypes associés	74
4.1	Corrélation avec l'âge de début de la MC	74
4.2	Corrélation du génotype avec la localisation de la MC	75
4.3	Corrélation du génotype avec l'intensité de la MC	76
4.4	Corrélation du génotype avec les signes extra-digestifs	76
5	Cas particulier : patient portant les trois allèles mutés	77
6	Facteurs environnementaux	78
6.1	Tabac	79
6.2	Facteurs alimentaires	80
6.3	Facteurs psychologiques : stress	81
7	Influence du sexe	82
8	Prédisposition familiale	83

Discussion générale	85
Conclusion et perspectives	87
Références bibliographiques	89

Annexes

Article (Daoui Z, Hammada T, Benlahcen B, Abadi N & Satta D. CARD15 gene polymorphisms in Algerian patients with Crohn's Disease: Genotype-Phenotype Correlation. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2016 ; 36(1): 22-29.

Abstracts de la 4ème JAM-Batna. *Batna J Med Sci* 2015;2:221-230

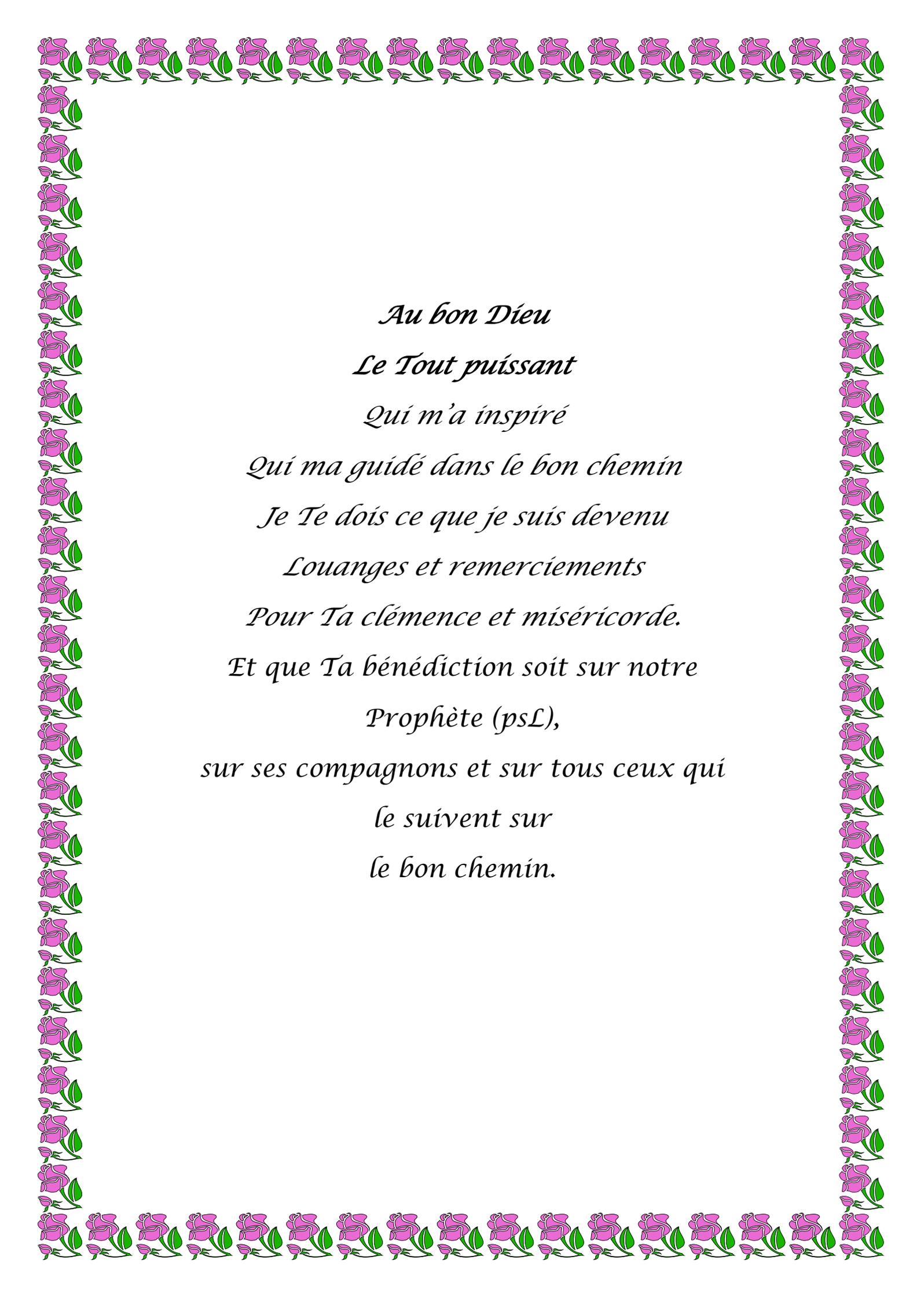
Résumé en arabe

Résumé en anglais

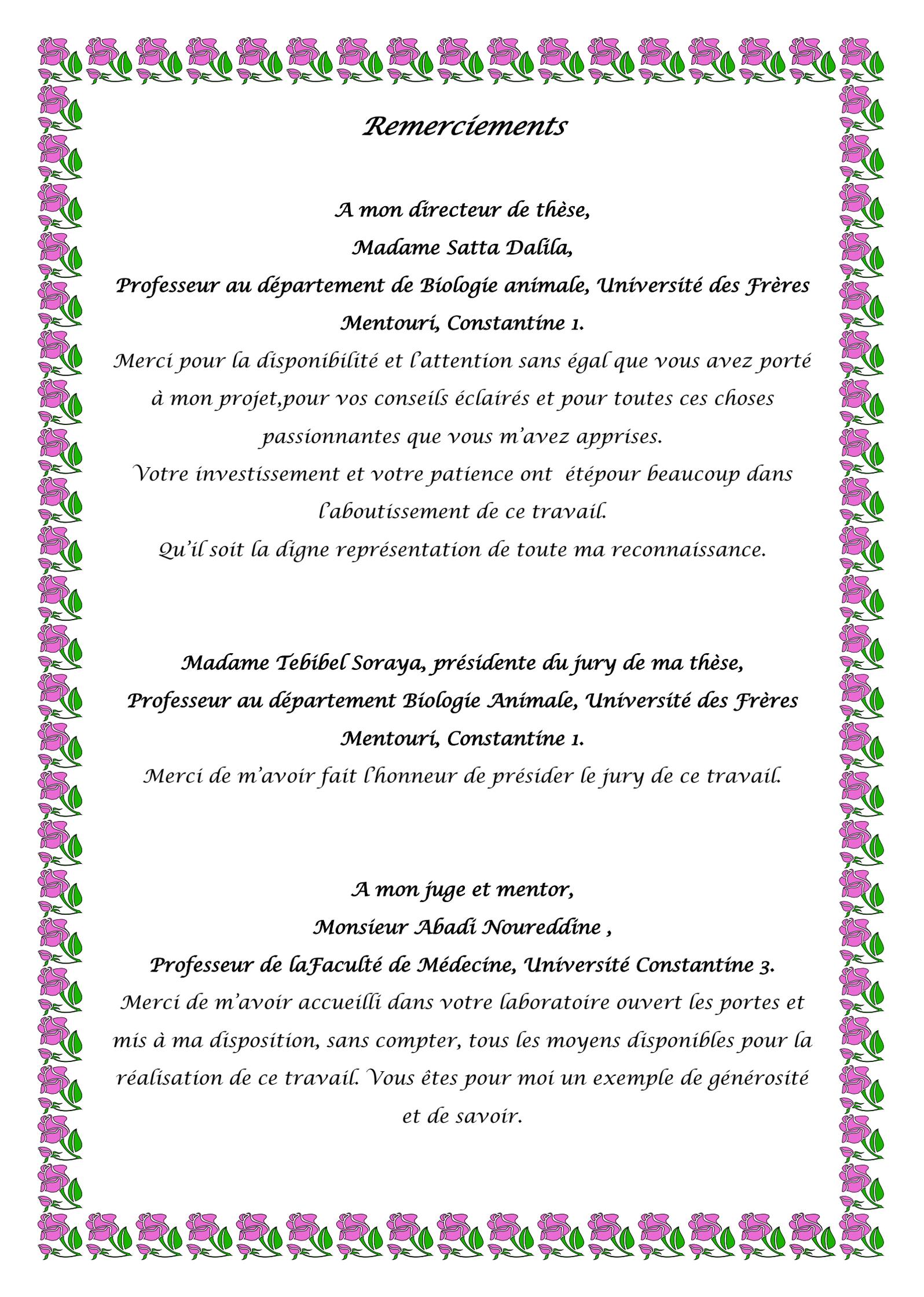
Résumé en français



Remerciements
et
dédicaces



*Au bon Dieu
Le Tout puissant
Qui m'a inspiré
Qui ma guidé dans le bon chemin
Je Te dois ce que je suis devenu
Louanges et remerciements
Pour Ta clémence et miséricorde.
Et que Ta bénédiction soit sur notre
Prophète (psL),
sur ses compagnons et sur tous ceux qui
le suivent sur
le bon chemin.*



Remerciements

A mon directeur de thèse,

Madame Satta Dalila,

*Professeur au département de Biologie animale, Université des Frères
Mentouri, Constantine 1.*

*Merci pour la disponibilité et l'attention sans égal que vous avez porté
à mon projet, pour vos conseils éclairés et pour toutes ces choses
passionnantes que vous m'avez apprises.*

*Votre investissement et votre patience ont été pour beaucoup dans
l'aboutissement de ce travail.*

Qu'il soit la digne représentation de toute ma reconnaissance.

Madame Tebibel Soraya, présidente du jury de ma thèse,

*Professeur au département Biologie Animale, Université des Frères
Mentouri, Constantine 1.*

Merci de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce travail.

A mon juge et mentor,

Monsieur Abadi Noureddine ,

Professeur de la Faculté de Médecine, Université Constantine 3.

*Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire ouvert les portes et
mis à ma disposition, sans compter, tous les moyens disponibles pour la
réalisation de ce travail. Vous êtes pour moi un exemple de générosité
et de savoir.*



A mon juge,

*Monsieur Hammada Talel, professeur de la faculté de Médecine,
Université Constantine 3, Service de Gastro-hépatologie, CHU
Constantine*

Merci de m'avoir communiqué votre respect et votre passion pour la profession, Pour m'avoir permis l'accès à toutes les données et m'avoir adjoint l'aide précieuse des différents membres du laboratoire ainsi que pour l'ouverture de votre service pour le recrutement des malades pendant toutes ces années. Je le remercie aussi pour sa participation en tant qu'examineur et membre de ce jury.

A mon juge,

*Madame Ghania Belaaloui, Professeur à la faculté de Médecine,
université Batna 2.*

j'exprime mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail A ma collègue,

Madame Benlahcene Boutheina,

Maitre assistante à la faculté de Médecine, université Batna 2.

Merci pour tous vos efforts dans le recrutement des malades au niveau de la wilaya de Batna.

A mes amis,

Dr Chellat Djalila, Sedrati Khadija et Semmam Warda qui m'ont accompagnée durant une période de 11 ans, merci pour vos conseils, au niveau de laboratoire et au moment de rédaction soit de l'article ou de la thèse.

A ma belle sœur Samia qui m'a donné des conseils sur le manuscrit.



DEDICACES

À ma famille, grâce à qui j'en suis là aujourd'hui, parce que vous avez toujours cru en moi et m'avez soutenue. Vous avez tous contribué chacun à sa manière à cette réussite... Je vous aime.

À Papa, un papa merveilleux qui est toujours là quand j'en ai besoin et se met en quatre s'il le faut. Quelques lignes ne suffissent pas à faire une longue et belle phrase digne de toi alors juste MERCI, pour tout.

À ma mère, qui m'a tant et tant donné et m'a si bien accompagnée tout au long de mes études. Merci maman.

À mon époux Delloul Abdelhamid, un énorme merci pour ta patience, ton écoute, tes conseils et ta présence tout au long de cette thèse. Je n'aurai jamais assez de ces quelques lignes dans ce manuscrit pour te remercier pour ton amour. De tout mon cœur, je t'aime.

À ma fille Djinene, mon ange qui me donne à chaque instant tant de joie et de bonheur : Je t'offre ce travail gage de mon amour.

À mes très chères sœurs Khaoula, Haoua, Aïcha, Balkis, Ibtihel et Bouchra : Votre soutien moral me restera toujours en mémoire. Je vous souhaite beaucoup de succès dans votre vie et surtout beaucoup de joie et de bonheur.



*À mes gentils beaux-frères Souheil, Abderahman, Amine et
Azzouz.*

À toute ma famille « Daoui » qui m'a toujours soutenue.

*À ma belle-famille « Delloul », qui m'a accueillie si
chaleureusement et dont le soutien est constant.*

*À mes amies, Wissem, Djalila, Warda, Djihan, Wahiba et Zahra
merci pour tout.*

*Ces années de thèse ont été riches en émotions et en rencontres, tant
sur le plan professionnel que personnel. Durant cette période, j'ai
rencontré des personnes formidables. Un grand Merci.*

*À tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail, et que
j'aurais oublié de citer.*

LISTE DES ABREVIATIONS

ASCA	Anticorps anti-Saccharomyces cerevisia
ATG16L1	Autophagy Related 16-Like 1
BBP	Bleu de Bromophénol
BET	Bromure d’Ethidium
CARD15	Caspase Recruitment Domain-Containing Protein 15
CDKAL1	CDK5 Regulatory Subunit Associated Protein 1-Like 1
CHU	Centre d’hospitalo-universitaire
CLR	Retinoic acid-inducible gene like receptors
CRP	C-Réactive Protéine
dNTP	DésoxyNucléotides-TriPhosphates
DO	Densité Optique
EDTA	Ethylen-Diamin_Tetra-acetic Acide
Epimad	Etude Prospective d’Incidence des MICI
GVH	Graft Versus Host
HEATR3	HEAT Repeat Containing 3
IBD	Inflammatory Bowel Disease 1
IFNα	Interfon α
IgE	Immunoglobuline E
IκB	Inihibitory Protein-KB
IL-12	Interleukine 12
IL-23R	Interleukin 23 receptor
IFX	Infliximab
IRF5	Interferon Regulatory Factor 5
IRGM	Immunity-related GTPase
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LAP	Lésions Ano- Périnéales
LPS	Lipopolysaccharides
LRR	Leucine Rich Repeat
LT	Lymphocytes T
LTA	Lymphotoxine Alpha
MC	Maladie de Crohn

MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MYO9B	Myosin IXB
NBD	Domaine liant les nucléotides
NFS	Numération de Formule Sanguine
NFκB	Nuclear Factor Kappa B
NLR	NOD-like Receptors
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NOD2	Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2
NOD-LR	Nucleotide oligomerization domain-like receptors
OCTN1	Organic cation transporter, novel type 1
OCTN2	Organic cation transporter, novel type 2
OR	Odds Ratio
ORMDL3	Orosomucoïd like 3
PAMP	Patterns moléculaires associés à des pathogènes
p-ANCA	Anticorps anticytoplasmique des polynucléaires neutrophiles
PCR	Polymerase chain reaction
PGN	Peptidoglycane
PTPN2	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 2
RCH	Rectocolite Hémorragique
RFLP	Fragment Length Polymorphism
RIP	Receptor Interacting Protein
SDS	Sodium Dodécyle Sulfate
SLC22A4	Solute carrier family 22, member 4
SLC22A5	Solute carrier family 22, member 4
TGF-β	Transforming Growth Factor
Th	Lymphocytes T-Helper (ou lymphocytes T auxiliaires)
TIR	Toll-Interleukin-1 Receptor
TLR	Toll-Like Receptors
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
UV	Ultra-Violet
VS	Vitesse de Sedimentation

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Données épidémiologiques de la MC dans quelque pays au monde	4
Tableau 2	Comparaison des classifications de Montréal et Vienne	13
Tableau 3	Principaux loci chromosomiques de susceptibilité pour les MICI	22
Tableau 4	Les amorces et la taille du produit de PCR pour les trois polymorphismes du gène <i>CARD15</i> (Forward=F=brin sens, Reverse=R=brin antisens)	38
Tableau 5	Composants du mélange réactionnel de PCR pour trois polymorphismes	40
Tableau 6	Génotypage du gène <i>CARD15/NOD2</i>	43
Tableau 7	Tableau de contingence	44
Tableau 8	Répartition des patients par tranche d'âge	45
Tableau 9	Age moyen selon certaines études	46
Tableau 10	Sex-ratio selon certaines séries	47
Tableau 11	Répartition des patients selon les régions et villes d'Algérie	49
Tableau 12	Fréquences des patients fumeurs dans certaines études	51
Tableau 13	Répartition des patients selon l'âge de début de la maladie	53
Tableau 14	Localisation de la maladie dans certain séries	54
Tableau 15	Distribution des différents phénotypes selon certaines séries	57
Tableau 16	Représentation des effectifs génotypiques du polymorphisme R702W chez la population témoin et patient	60
Tableau 17	Fréquences de l'allèle muté chez les patients et les témoins	60
Tableau 18	Comparaison des fréquences alléliques du polymorphisme R702W chez certaines populations	61
Tableau 19	Corrélation du polymorphisme R702W et l'âge de début de la maladie	62
Tableau 20	Corrélation du polymorphisme R702W et la localisation de la MC	62
Tableau 21	Corrélation du polymorphisme R702W et l'intensité de la maladie	63
Tableau 22	Corrélation du polymorphisme R702W et les signes extra-digestifs	64
Tableau 23	Représentation des effectifs génotypiques du polymorphisme G908R chez la population témoin et malade	65
Tableau 24	Fréquences de l'allèle muté chez les patients et les témoins	66
Tableau 25	Comparaison des fréquences alléliques du G908R chez certaines	66

	populations	
Tableau 26	Corrélation de l'âge de début et le polymorphisme G908R	67
Tableau 27	Corrélation de la localisation de la MC et le polymorphisme G908R	67
Tableau 28	Corrélation du polymorphisme G908R et l'intensité de la MC	68
Tableau 29	Corrélation du polymorphisme G908R et les signes extra-digestifs	69
Tableau 30	Représentation des effectifs génotypiques du polymorphisme 1007fs chez les populations témoin et malade	70
Tableau 31	Fréquences de l'allèle muté chez les patients et les témoins	71
Tableau 32	Comparaison des fréquences alléliques du 1007fs chez certaines populations	71
Tableau 33	Corrélation du polymorphisme 1007fs et la localisation de la MC	72
Tableau 34	Corrélation du polymorphisme 1007fs et l'intensité de la maladie	73
Tableau 35	Corrélation du polymorphisme 1007fs et les signes extra-digestifs	74
Tableau 36	Corrélation de la présence d'un allèle muté et l'âge de début de la MC	75
Tableau 37	Corrélation de la présence d'un allèle muté et la localisation de la MC	75
Tableau 38	Corrélation de la présence d'un allèle et l'intensité de la maladie	76
Tableau 39	Corrélation de la présence d'un allèle muté et les différents signes extra-digestifs	77
Tableau 40	Caractéristiques cliniques du patient (cas particulier)	78
Tableau 41	Corrélation mutation-tabac	80
Tableau 42	Répartition du polymorphisme selon le sexe	82
Tableau 43	Corrélation entre le polymorphisme et les antécédents familiaux	83

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Mécanismes de défense de la barrière épithéliale intestinale	18
Figure 2	Structure du gène CARD15	23
Figure 3	Représentation schématique de la structure répétitive du PGN	24
Figure 4	Maintien de l'homéostasie intestinale et mécanismes de reconnaissance	25
Figure 5	Maintien de l'homéostasie intestinale et mécanismes de reconnaissance bactérienne par les cellules dendritiques ou les macrophages	27
Figure 6	Sites mutationnelles du gène <i>CARD15/NOD2</i>	28
Figure 7	Rôle du CARD15 dans la MC	30
Figure 8	Gènes de susceptibilité (en noir) communs à plusieurs maladies (en rouge) et formant un réseau de maladies	31
Figure 9	Carte des risques moléculaires prédisposant à la MC	33
Figure 10	Répartition selon l'âge et le sexe	47
Figure 11	Répartition des localisations selon l'âge des patients	55
Figure 12	Répartition des localisations selon le sexe	55
Figure 13	Répartition de l'intensité de la maladie selon l'âge des patients	58

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photographie 1	Profil de migration électrophorétique des produits de PCR du polymorphisme R702W	41
Photographie 2	Profil de migration électrophorétique des produits de PCR du polymorphisme G908R	42
Photographie 3	Profil de migration électrophorétique des produits de PCR du polymorphisme 1007fs	42
Photographie 4	Profil de digestion des amplicons du polymorphisme R702W	59
Photographie 5	Profil de digestion des amplicons du polymorphisme G908R	65
Photographie 6	Profil de digestion des amplicons du polymorphisme 1007fs	70

Introduction

Introduction

La maladie de Crohn (MC) fait partie d'un ensemble de pathologies appelées «maladies inflammatoires chroniques de l'intestin» (MICI). Parmi les maladies concernées, deux formes principales se distinguent : la MC et la rectocolite hémorragique (RCH), dans notre étude nous nous focaliserons sur la MC.

L'incidence et la prévalence de la MC sont en constante augmentation dans le monde. 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 100 000 habitants et la prévalence est de 0,6 à 322 cas pour 100 000 habitants (Molodecky *et al.*, 2012).

Les pays émergents d'Amérique latine commencent à voir augmenter leurs valeurs épidémiologiques, du fait de leur industrialisation. L'Afrique, par ailleurs, est considérée comme un continent de faible incidence. En Algérie, l'épidémiologie de cette maladie est mal connue, mais une étude a été réalisée entre 2003 et 2007, a révélé une incidence de 5,87/100 000 habitants et une prévalence de 19,02/100 000 habitants (Hammada *et al.*, 2011). Globalement, la répartition mondiale homme/femme semble équilibrée (Cosnes *et al.*, 2011).

Cette pathologie qui se caractérise par l'inflammation chronique de la paroi intestinale qui conduit à la perte de fonction physiologique de l'intestin. Elle peut atteindre n'importe quelle partie du tube digestif, de la cavité buccale jusqu'à l'anus. C'est une maladie qui comporte des phases d'activité d'intensité variable alternant avec des phases de rémission et se distingue par : la forme iléale (ou iléocœcale) et la forme colique. L'atteinte iléale est la plus fréquente, retrouvée chez deux tiers des patients avec sténose, fistules et abcès. La MC est souvent diagnostiquée vers l'âge de 20 ans. Cependant la population pédiatrique et les personnes plus âgées sont également atteintes par cette maladie.

Certains critères ont été établis pour différencier les phénotypes de la MC (critères de Vienne ou de Montréal) et sont basés sur l'âge d'apparition de la maladie, sa localisation et son comportement, défini par le développement de complications sténosantes et/ou fistulisantes de la maladie.

La MC implique une susceptibilité génétique, une flore intestinale perturbée, un dysfonctionnement immunitaire et un rôle de l'environnement. Plus d'une centaine de gènes et de loci impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire innée et acquise, ainsi que dans l'homéostasie de la muqueuse intestinale, ont été identifiés. Actuellement, seuls le tabagisme et l'appendicectomie sont des facteurs validés, clairement associés à un risque accru et des formes plus sévères de MC. La flore intestinale et la dysbiose décrite pourraient contribuer au déclenchement ou à l'entretien de l'inflammation.

Introduction

La preuve d'une contribution génétique dans la MC est également 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 (Bengtson *et al.*, 2009).

Franke et al (2010), à travers une méta-analyse ont mis en évidence 71 loci à risque dans la MC, dont le locus *IBD1* est le plus important comprenant le gène *NOD2* (*nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*, alias *CARD15*). C'est le premier gène fortement associé à la MC, il est situé sur le chromosome 16 (16q12). Ce gène joue un rôle important dans la défense de l'organisme en stimulant la réponse immunitaire par la reconnaissance des peptidoglycanes bactériens.

Un variant du gène est présent chez un malade sur deux, mais également chez 20% des sujets sains. La protéine *CARD15/NOD2* est impliquée dans l'immunité innée : elle est capable d'activer *NF-κB* qui lui-même induit l'expression de nombreuses molécules pro-inflammatoires. Les mutations principales associées à la MC entraînent une inhibition de la production de *NF-κB* (Bouladoux *et al.*, 2013). Il est également possible qu'un gène *CARD15/NOD2* défectueux conduise à une augmentation de la colonisation par des bactéries de la lumière intestinale et plus particulièrement au niveau des cryptes intestinales.

Plus de 30 variants au sein du gène *CARD15/NOD2* ont été rapportés jusqu'à l'heure actuelle. Cependant, il a été démontré que trois principales variants génétiques étaient associés à une augmentation du risque de la MC (Hugot *et al.*, 2002). Il s'agit des variants R702W, G908R et 1007fs qui représentent ensemble plus de 80% des mutations. L'existence de trois mutations prédominantes rend relativement facile une analyse du gène et la plupart des études ne portent en fait que sur ces trois variants.

Objectifs de notre travail :

- Réaliser une enquête prospective auprès des services de gastro-entérologie afin de recruter les patients diagnostiqués pour une MC.
- A travers une enquête auprès des cas index, une classification phénotypique basée sur le diagnostic.
- Etudier les facteurs de risque de la MC.
- Réaliser l'analyse moléculaire du gène *CARD15/NOD2*, en étudiant les trois polymorphismes cités plus haut.
- Mettre en évidence les associations éventuelles gène/pathologie, génotype/phénotype et facteurs de risques/maladie.



Etude Bibliographique

I. Aspect clinique et épidémiologique de la MC

1. Epidémiologie

1.1. Répartition mondiale de la MC

La MC a été décrite par un chirurgien allemand, Wilhelm Fabry en 1623, puis la pathologie a été décrite par le docteur américain Burill B. Crohn en 1932 dont le nom a été retenu pour désigner la maladie.

Les données épidémiologiques de la MC sont en constante évolution depuis sa découverte et se sont profondément modifiées ces dernières décennies. En Europe un million de patients seraient atteints par la MC avec une incidence de 50 800 nouveaux cas de MC par an (Molodecky *et al.*, 2012), alors qu'en Amérique du Nord, près de 700 000 personnes sont atteintes de MC, 44 000 nouveaux cas de MC sont diagnostiqués chaque année (Vernier G *et al.*, 2005).

L'incidence de la MC montre donc de grandes disparités selon les pays (Tableau 1), mais elle évolue dans le temps. Ainsi une augmentation de son incidence est observée depuis 50 ans et dans presque toutes les régions du globe. Cette augmentation a touché les pays occidentaux, mais aussi des pays où, il y a encore 15 ans, la maladie était peu répandue comme la Corée du Sud, la Chine, l'Inde, l'Iran, l'Afrique du Nord ou encore la Thaïlande et le Japon (Cosnes *et al.*, 2011).

En Amérique latine, la MC est encore peu fréquente mais son émergence paraît plus rapide que dans les pays d'Asie. Au Brésil, l'incidence a été estimée à 3,5 nouveaux cas pour 10⁵ habitants (Burisich *et al.*, 2013).

En Algérie, l'épidémiologie de ces maladies est mal connue, mais une thèse de doctorat de sciences médicales qui s'est intéressée aux aspects épidémiologiques et anatomo-cliniques des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin au niveau de la wilaya de Constantine, de l'année 2003 à 2007, a révélée un taux d'incidence annuel moyen de 5,87/100 000 habitants et un taux de prévalence de 19,02/100 000 habitants (Hammada *et al.*, 2011).

L'étude de l'évolution de la MC dans le temps permet de caractériser nettement un gradient Nord-Sud, la MC est plus fréquente au Nord (Hovde et Moum, 2012). De plus ce gradient s'inscrit également dans un contexte plus local. Au sein même d'un pays, le gradient Nord-Sud est présent. En France, par exemple, la région Nord- Pas de Calais étant la région la plus touchée de France (Economou *et al.*, 2009). Cette répartition géographique de la MC est en partie due à l'industrialisation des pays.

Etude bibliographique

Cependant les raisons précises ne sont pas encore réellement élucidées. Le mode de vie, l'alimentation, l'environnement sont autant de facteurs qui peuvent expliquer la répartition de cette maladie.

Tableau 1 : Données épidémiologiques de la MC dans quelque pays au monde (Morel, 2014)

PaNHys	Année	Population concernée	Prévalence (%)	Incidence
Croatie	2001	46,4/10 ⁵ ≈ 2000 patients	0,047	5,7/10 ⁵
Suède	2002	151/10 ⁵ ≈ 14500 patients	0,15	9,6/10 ⁵
Japon	2005	21,2/10 ⁵ ≈ 27100 patients	0,021	1,2/10 ⁵
Espagne	2005	116/10 ⁵ ≈ 54850 patients	0,11	7,3/10 ⁵
Brésil	2005	5,65/10 ⁵ ≈ 10500 patients	0,0056	3,5/10 ⁵
Chine	2006	3,5/10 ⁵ ≈ 46000 patients	0,0035	1/10 ⁵
France	2007	101/10 ⁵ ≈ 72500 patients	0,11	6,7/10 ⁵
Etats-unis d'Amérique	2008	241,3/10 ⁵ ≈ 758000 patients	0,17	5,64/10 ⁵
Australie	2008	137,3/10 ⁵ ≈ 28000 patients	0,137	17,4/10 ⁵
Canada	2012	369,8/10 ⁵ ≈ 758000 patients	0,37	13,6/10 ⁵
Royaume uni	2012	181,8/10 ⁵ ≈ 115000 patients	0,18	9,56/10 ⁵
Inde	2012	Non renseigné	Non renseigné	0,14/10 ⁵

1.2. Impact socio-culturel

1.2.1. Age

Dans la majeure partie de la population, la MC est diagnostiquée entre 20 et 30 ans. Cependant les cas chez l'enfant sont loin d'être exceptionnels. Ainsi, environ 20 à 30% des symptômes apparaissent avant l'âge de 20 ans, quel que soit l'âge du diagnostic. Donc la MC est considérée comme l'une des principales pathologies chroniques de l'enfant et de l'adolescent (Judge et Giordano, 2014).

Par ailleurs, on constate que, s'il existe un historique familial positif dans la pathologie, celui-ci est surtout mis en évidence dans les formes précoces, ainsi, 30% environ des patients chez lesquels la pathologie est diagnostiquée avant 20 ans sont concernés par ces formes familiales. Ce pourcentage décroît à 18% quand le diagnostic se fait entre 20 et 39 ans puis à 13% après 40 ans (Benedini *et al.*, 2012).

1.2.2. Sexe

La MC est une pathologie plus fréquente chez la femme que chez l'homme avec un «sex ratio» de 0,7 à 0,8. Cela est observé surtout dans les régions de forte incidence. En revanche, dans les formes pédiatriques (début de la maladie avant 17 ans), la maladie prédomine chez les garçons. Par exemple, aux Etats-Unis le «sex-ratio » est de 1,6 avant 20 ans (Judge et Giordano, 2014).

1.2.3. Ethnie

Des différences d'incidences ont permis de démontrer l'existence de facteurs ethniques. La MC est plus fréquente dans les populations de race blanche, rare chez les noirs et exceptionnelle chez les asiatiques (Economou *et al.*, 2009 ; Prideaux L *et al.*, 2012). De faibles prévalences ont ainsi été constatées aux Etats-Unis, chez les groupes d'indiens, d'Amérique du Nord, les noirs américains, les migrants latino-américains, les Maoris et les asiatiques (Kappelman *et al.*, 2013).

Ces données soutiennent l'idée d'une combinaison de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux dans la pathogénie de la MC (Cavanaugh, 2006 ; Cosnes *et al.*, 2011). Toutefois, les groupes ethniques ne se distinguent pas seulement par leur patrimoine génétique, mais aussi par de nombreux facteurs socio-culturelle.

2. Anatomie, histologie et physiologie de tube digestif

Sur le plan anatomique, il comprend plusieurs segments:

2.1. L'œsophage

Tube musculueux d'environ 25cm qui assure le transport des aliments depuis le pharynx jusqu'à l'estomac. Il traverse le médiastin thoracique, le diaphragme et débouche dans l'estomac au niveau du cardia (sphincter).

Il est composé de 4 couches/tuniques :

- **La muqueuse:** épithélium pavimenteux contenant les glandes à mucus. Non équipé pour résister aux reflux acides du contenu gastrique.
- **La sous muqueuse:** tissu conjonctif riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques, fibres nerveuses et fibres élastiques.
- **La musculueuse:** constituée d'une couche circulaire et d'une couche longitudinale, et joue le rôle de mélanger et propulser les aliments dans le tube digestif par péristaltisme.

Etude bibliographique

- **L'adventice fibreux**: tissu conjonctif fibreux (Pellestor, 2008).

2.2. L'estomac

Poche musculaire en forme de J, situé dans la partie supérieure et postérieure de l'abdomen entre œsophage et duodénum au niveau de l'hypochondre gauche et de l'épigastre. Le fundus et le corps sont les zones excrétrices d'acides chlorhydriques, de pepsine et de mucus. L'antrum contient des glandes sécrétant la gastrine (hormone peptidique).

Il est composé de plusieurs couches :

- **Muqueuse**: épithélium cylindrique présentant de profonds replis et ponctuée de cryptes conduisant aux glandes gastriques. Elle contient des glandes à mucus et des cellules sécrétrices.
- **La sous muqueuse** : richement vascularisée.
- **La musculuse**: ensemble de muscles circulaires et longitudinaux mais aussi oblique ayant un rôle de pétrissage par malaxage et succession d'ondes péristaltiques
- **La séreuse** : tissu conjonctive de protection (Kohler, 2011).

2.3. L'intestin grêle

C'est un segment qui fait suite à l'estomac et présente l'organe principal de la digestion et d'absorption des nutriments dans le sang. Il est constitué de 3 segments (le duodénum, le jéjunum et l'iléon). La surface de l'intestin grêle est considérablement agrandie grâce à 3 niveaux de replis : les valvules conniventes, les villosités et les microvillosités (Pellestor, 2008).

L'épithélium est composé d'une seule couche cellulaire avec 4 types de cellules :

- Entérocytes : absorbent les nutriments.
- Cellules caliciformes: produisent le mucus qui agit comme une barrière physique contre les bactéries commensales et qui empêche l'apparition de réactions inflammatoires contre ces agents.
- Cellules de Paneth : sécrètent les défensines, peptides antibactériens qui dégradent les membranes bactériennes tout en préservant les cellules intestinales, ainsi que du lysozyme qui lyse le peptidoglycane et les phospholipases.
- Cellules endocrines : sécrètent diverses hormones (Kohler, 2011).

Etude bibliographique

L'intestin grêle joue 4 fonctions:

- **Fonction motrice:** (le brassage)
 - La segmentation: série de contractions localisées qui assurent le mélange du chyme et des enzymes digestives, et met les produits de digestion en contact avec la muqueuse afin qu'ils soient absorbés, mais ne fait pas avancer le chyme.
 - Le péristaltisme: propulse le chyme dans le tube digestif, les contractions sont faibles.
- **Fonction d'absorption:** en lien avec les villosités et avec l'aide des enzymes intestinales, la majorité de l'absorption se produit au niveau jéjunal. La voie sanguine est empruntée par les sucres simples et les acides aminés.
- **Fonction endocrine et exocrine:**
 - Production de 2 litres de mucus et de sucs contenant quelques enzymes. L'essentiel des enzymes proviennent de la libération du contenu endo-cellulaire libéré de la desquamation des cellules de la muqueuse intestinale.
 - Production d'hormones: gastrine, cholécystokinine, sécrétine, motiline, somatostomaline.
- **Fonction immunitaire :**

La Présence de lymphocytes dans la paroi, véritable barrage contre les agressions bactériennes et le risque de translocation. Diminution de l'acidité du chyme

Permettre la digestion des substances contenues dans le chyme par la bile, le suc pancréatique et les enzymes afin des les transformer en nutriments assimilables (Pellestor, 2008).

2.4. Le gros intestin

Composé de plusieurs segments : le cæcum, l'appendice, le côlon ascendant, le côlon descendant, le côlon transverse, le côlon sigmoïde et le rectum (ampoule rectale et canal anal)
La structure est semblable aux autres organes du tube digestif, mais la muqueuse est épaisse avec de nombreuses cellules à mucus.

Le gros intestin remplit plusieurs rôles importants dans la digestion. Ses fonctionnements principaux sont :

Etude bibliographique

- L'eau Absorbante : Complétant le procédé de la digestion qui a lieu en grande partie dans l'intestin grêle. Cela prend presque 24 à 30 heures pour compléter le procédé digestif. Davantage de digestion ou de décomposition des éléments nutritifs n'a pas lieu ici mais elle aide en absorbant l'eau et en rendant les tabourets solides.
- Absorption des vitamines : Le gros intestin aide également dans l'absorption des vitamines effectuée par les bactéries qui vivent normalement dans le gros intestin. Ce sont les bactéries commensales appelées de bactéries amicales. Il y a plus de 700 substances des bactéries qui remplissent un grand choix de fonctionnements.
- Réduction de l'acidité et protection contre des infections : La muqueuse du gros intestin sécrète également des bicarbonates pour neutraliser l'acidité accrue résultant de la formation de ces acides gras et d'autres composants digestifs aux parties précédentes des intestins.

La couche muqueuse du gros intestin également agit en tant que barrage muqueux et se protège contre des infections microbiennes et des invasions.

- Production des anticorps : Le gros intestin, en particulier l'appendice, est un confluent de plusieurs tissus lymphoïdes. Ceux-ci jouent un rôle majeur dans l'immunité. (Kohler, 2011).

3. Diagnostic

3.1. Manifestations cliniques

La MC est caractérisée par l'alternance de poussées d'intensité variable, entrecoupées de phases de rémission plus ou moins complètes et prolongées. Lors des poussées, la nature des manifestations cliniques dépend de la localisation des lésions sur les différents segments du tube digestif. Les principales manifestations évocatrices de la MC sont d'ordre digestif, accompagnées de signes généraux et plus rarement de signes extra-digestifs, diversement associés chez chaque malade (Peyrin-Biroulet, 2011).

- **Manifestations générales** : sont représentés par une altération progressive de l'état générale avec asthénie, anorexie et amaigrissement. Ainsi la fièvre lors des poussées. Les signes de dénutrition sont liés au retentissement métabolique et nutritionnel de la maladie (Annexe 1).
- **Manifestation digestives** : les douleurs abdominales survenues très fréquente (90% cas) avec une diarrhée hydrique glairo- sanglantes dans les formes coliques ou des

Etude bibliographique

diarrhées motrices et steatorrhée traduisant la malabsorption dans les formes grêliques (Boudiaf *et al.*, 2000; Bister, 2014).

- **Manifestations ano-périnéales:** sont caractéristiques de la MC, ayant une grande valeur diagnostique, pouvant révéler chez 25% des malades. Les lésions ano-périnéales (LAP) spécifiques de la MC sont des fissures, un pseudo-morisque ulcérée, des ulcères canaux, des fistules souvent à multiples orifices et des abcès peri-anaux inters-sphinctériens ou ischio-anaux. Les lésions entraînent des douleurs à la défécation, un suintement ou un écoulement purulent, elles ont une tendance destructrice pouvant aboutir à une incontinence anale (Boualam, 2010).
- **Manifestation extra- digestives**
 - **Manifestation ostéo-articulaire :** Les arthrites périphériques, les spondylarthrites ankylosante et les sacro-iliite isolées.
 - **Manifestation cutané-muqueuses :** L'érythème noueux, Le pyoderma gangrenosum et les aphtes buccaux.
 - **Manifestation ophtalmologiques :** l'épisclérite et l'uvéite antérieure aigue qui sont fréquemment associées à l'atteinte articulaire.
 - **Manifestations hépato-biliaire :** Stéatose hépatique, pericholangite, hépatite granulomateuses, abcès hépatiques, cholangite sclérosante primitive et rarement lithiase biliaire, hépatite chronique active.
 - **Manifestation cardio-vasculaires :** endocardites infectieuse, accidents thrombo-emboliques liés à un état d'hypercoagulabilité d'origine multifonctionnelle
 - **Autres manifestations :** Broncho-pulmonaires (Alvéolite lymphocytaire, granulomatose pulmonaire,..), l'Amylose (hépatique et rénale) et la lithiase urinaire oxalique (Larson, 2010 ; Staumont, 2010) (Annexe 2).

3.2.Diagnostic

Le diagnostic est, dans la majorité des cas, évoqué par le médecin traitant suite à une consultation qui a lieu en période de poussée. Le patient consulte habituellement pour des douleurs abdominales, des diarrhées auxquelles s'associent parfois des atteintes de la région péri-anale, des signes généraux et/ou des manifestations secondaires.

L'évaluation initiale, la prise en charge du patient et la pose d'un diagnostic définitif font intervenir une équipe pluridisciplinaire composée du médecin traitant, d'un hépato-gastro-entérologue, de biologistes, d'anatomo-pathologistes et, si besoin, d'autres spécialistes (rhumatologue, dermatologue, ophtalmologiste...).

Etude bibliographique

Le diagnostic de la MC peut être difficile à réaliser et il nécessite d'écarter les autres causes d'atteintes organiques intestinales (infectieuses, ischémiques, médicamenteuses, néoplasiques...) (Peyrin-Biroulet, 2011).

En pratique il n'existe aucun test permettant d'affirmer à lui seul l'existence ou non d'une MC. Le diagnostic repose en réalité sur un faisceau d'arguments cliniques et paracliniques faisant intervenir la biologie et l'imagerie médicale (Annexe 3).

3.2.1. Diagnostic différentiel

Il doit être envisagé en fonction des situations cliniques. La première poussée de type colite peut être confondue avec une colite bactérienne, parasitaire ou virale provoquée par le cytomégalovirus chez l'immunodéprimé.

- La forme iléale de la MC doit être différenciée d'une appendicite aiguë, d'une iléite infectieuse ou encore d'un lymphome intestinal.
- Les formes jéjunales ou iléales étendues sont fréquemment confondues avec la forme intestinale de la tuberculose, les lymphomes, la maladie cœliaque ou encore la maladie de Whipple (Annexe 4).
- Les formes iléocoliques chroniques peuvent être confondues avec des vascularites ou des entéropathies ischémiques.

Dans 10 à 20 % des premières poussées de MICI de type colite isolée, il n'est pas possible de faire la distinction entre une MC et une RCH : on parle alors de colite indéterminée (Laas *et al.*, 2014).

Pour progresser dans le diagnostic, on peut s'aider d'arguments épidémiologiques, sérologiques et histologiques qui peuvent donner les différences entre MC et RCH (Annexe 5).

3.2.2. Exploration diagnostiques

3.2.2.1. Examens biologiques

La valeur diagnostique des examens biologiques reste modeste. En effet, il n'existe aucun signe biologique spécifique de la MC. Les examens réalisés ont pour but de confirmer le caractère organique des symptômes, d'éliminer une cause infectieuse ou parasitologique et d'étudier le retentissement de la maladie (Annexe 6).

Le bilan biologique standard comprend :

Etude bibliographique

- Une numération et formule sanguine (NFS) : à la recherche d'une anémie, (diminution du taux d'hémoglobine), d'une hyperleucocytose et d'une hyperplaquettose,
- La recherche d'un syndrome inflammatoire : le syndrome inflammatoire est caractérisé par l'augmentation de la vitesse de sédimentation (VS) et du taux de protéine C réactive (CRP) (Laas *et al.*, 2014).
- L'évaluation de l'état nutritionnel et la recherche de carences en vitamines et en micronutriments : dosage des protides sanguins, cholestérolémie, albuminémie et bilan électrolytique (calcium, magnésium...) et dosages des oligo-éléments et des différentes vitamines (Hartman *et al.*, 2009).

Selon la présentation clinique, le médecin peut demander une coproculture ou un examen parasitologique des selles afin d'écartier une cause infectieuse ou bactériologique.

Les marqueurs sérologiques de choix des MICI sont, à ce jour, l'association ASCA (anticorps anti-Saccharomyces cerevisia) et p-ANCA (anticorps anticytoplasmique des polynucléaires neutrophiles). Plus récemment, ont été découverts des anticorps dirigés contre une protéine de la membrane externe d'*E. coli* (Ac anti-OmpC), des anticorps dirigés contre une séquence bactérienne de *Pseudomonas fluorescens* (Ac anti-I2) ou encore des anticorps anti-flagelline (CBir1) chez des patients atteints de MICI (Peyrin-Biroulet, 2011).

La poursuite de ces recherches fait espérer la découverte d'une classification sérologique fiable qui pourrait constituer un outil diagnostique solide. Cependant à l'heure actuelle ils ne constituent qu'une aide supplémentaire parmi les faisceaux d'arguments cliniques, biologiques et endoscopiques.

3.2.2.2. Imagerie médicale

L'exploration digestive, grâce aux techniques d'imagerie médicale, est indispensable pour établir le diagnostic de la MC (Annexe 7).

- **Endoscopie** : L'exploration par endoscopie permet de visualiser l'intérieur des organes, d'un conduit ou d'une cavité à l'aide d'un endoscope introduit par voie naturelle. L'endoscopie permet d'affirmer le diagnostic, de réaliser des biopsies étagées et d'apprécier l'extension des lésions (Beau *et al.*, 2004).
- **Radiologie** : La place des examens radiologiques dans le cadre de la MC s'est considérablement réduite suite à l'avènement de l'endoscopie. Ils restent cependant utiles dans certains cas (Beau *et al.*, 2004).

Etude bibliographique

- **Vidécapsule endoscopique :** L'examen par vidécapsule endoscopique implique d'avaler une petite capsule à usage unique fabriquée dans un matériau biocompatible et résistant à la digestion. Cette technique présente l'intérêt d'être non irradiante et non invasive, mais elle est contre-indiquée en cas de signes occlusifs cliniques ou de sténose longue car la capsule risque de rester bloquée dans le tractus digestif (Herfarth, 2008).
- **Autres techniques :** Les techniques radiographiques exigeantes en temps et en radiologues expérimentés sont aujourd'hui supplantées par des techniques d'imagerie en coupe. Ces techniques permettent l'exploration d'éventuelles LAP ou l'appréciation de possibles complications digestives ou extra-digestives. Il y a plusieurs types, l'entéro-scanner, l'imagerie à résonance magnétique (IRM) et l'échographie et le Doppler (Oudjit *et al.*, 2005 ; Peyrin-Biroulet, 2011).

Il est à noter qu'en Algérie, à l'heure actuelle, beaucoup de ces examens ne font pas partie des bilans demandés.

4. 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. (Tableau 2)

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).

Etude bibliographique

Tableau 2: Comparaison des classifications de Montréal et Vienne (Laas *et al.*, 2014)

	Vienne	Montréal
Age de diagnostic	A1 : < 40 ans A2 : > 40 ans	A1 : < 17 ans A2 : 17 < âge < 40 ans A3 : > 40 ans
Localisation	L1 : iléal L2 : colon L3 : iléo-colique L4 : en amont du tiers distal de l'iléon	L1 : iléal L2 : colon L3 : iléo-colique L4 : en amont du tiers distal de l'iléon
Intensité	B1 : non fistulissante, non sténosante B2 : sténosante B3 : fistulissante	B1 : non fistulissante, non sténosante B2 : sténosante B3 : fistulissante P : atteinte périanale

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. 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 40 ans, ce sont les formes des personnes plus âgées, beaucoup plus rare, elles sont souvent moins invalidantes (Saussure et Bouhnik, 2007).

4.2. 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).

4.3. 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 péri-anaux 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.

5. Traitement

Les traitements actuellement disponibles ont pour objectif la cicatrisation muqueuse et le contrôle des poussées et la prévention des récives. Ils visent aussi à maintenir la qualité de vie des malades. Aucun traitement n'est en mesure de guérir complètement la maladie.

La première démarche thérapeutique à mettre en œuvre est l'arrêt définitif et complet du tabagisme, dont les effets nocifs sur la gravité et l'évolution de la maladie sont importants.

Les dérivés aminosalicylés sont peu efficaces pour le traitement des poussées de MC. Leur rôle est important dans la diminution du risque de survenu de cancer intestinal et d'éviter la récdivité.

Les corticoïdes constituent le traitement de base des poussées d'intensité moyenne ou sévères. Ils sont utilisés sur de courtes périodes, afin de limiter les effets secondaires. Les corticoïdes ne sont pas efficaces pour prévenir le risque de récdivité. Ils ne doivent pas être utilisés en traitement d'entretien (Klotz *et al.*, 2015).

Les immunosuppresseurs se sont largement développés. Ils agissent de manière très ciblée sur certains composants du système immunitaire : l'Azathioprine, le 6-Mercaptopurine et le Methotrexate sont les plus souvent prescrits en traitement d'entretien et utilisés pour les formes évolutives ou de traitement difficile.

Les biothérapies : l'Infliximab (IFX) et l'Adalimumab sont des anticorps monoclonaux qui neutralisent le TNF α . Le traitement peut être utilisé pour les poussées réfractaires, les formes fistulisantes et comme traitement d'entretien. D'autres anticorps dirigés contre le TNF α sont en cours d'essai (Poupardin *et al.*, 2006 ; Tougeron *et al.*, 2009).

Outre la nécessité d'une alimentation adaptée, un traitement nutritionnel peut s'avérer nécessaire. En tant que thérapeutique adjuvante ou comme traitement spécifique, cette assistance nutritionnelle peut être entérale (par sonde nasogastrique) ou parentérale (par voie veineuse).

Le traitement chirurgical est nécessaire en cas d'évolution défavorable de la maladie ou de la survenue de complications (sténoses, fistules) Elle ne constitue malheureusement pas un traitement curatif.

Les protocoles thérapeutiques : une chance pour les malades ! Malgré les progrès considérables de ces dernières années, tout n'est pas résolu et de nombreux malades «échappent» à leur traitement. Ces protocoles ont pour but de tester de nouvelles alternatives

thérapeutiques mais aussi d'optimiser des schémas de prises en charge (Klotz *et al.*, 2015) (Annexe 8).

6. Etiologies de la MC

L'hypothèse étiologique actuelle est celle d'une maladie multifactorielle survenant chez des sujets génétiquement prédisposés, au cours de laquelle une réponse immunitaire muqueuse anormale survient en réaction à des composants de la microflore intestinale, déclenchée ou aggravée par des facteurs environnementaux.

6.1. Rôle du système immunitaire

La paroi de l'intestin possède plusieurs rôles comme l'absorption des nutriments et la protection contre les microbes présents dans la lumière intestinale. L'épithélium intestinal permet cette protection. Une défaillance dans la composante physique contribue à une augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal alors qu'une défaillance dans les défenses chimiques ou immunitaires entrainera une dysbiose qui modifiera la composition du microbiote. Une réponse immunitaire sera alors activée ce qui peut entraîner une inflammation chronique et mener au développement à des maladies inflammatoires de l'intestin comme la MC (Matricon, 2010).

Les entérocytes de la barrière épithéliale doivent pouvoir faire la distinction entre les micro-organismes pathogènes, de ceux qui sont bénéfique, comme les bactéries commensales. Ceci est possible grâce à l'expression de récepteurs membranaires, comme les toll-like receptor TLR4 et TLR5, capables de reconnaître les structures bactériennes telles que les polysaccharides et les protéines de leur membrane (Zouiten-Mekki *et al.*, 2013).

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

6.1.1. La réponse immunitaire innée

Cette immunité est effectrice grâce à de nombreux types de cellules telles que les cellules épithéliales, les polynucléaires neutrophiles, les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les cellules NK (« natural killer » ou cellules tueuses naturelles). Ces cellules agissent ensemble pour permettre le déclenchement de l'inflammation par la sécrétion de cytokines, de chimiokines et d'agents antimicrobiens. Cela conduit à la phagocytose des

Etude bibliographique

cellules infectées et des micro-organismes, la présentation de l'antigène aux lymphocytes T et le déclenchement de la réponse immunitaire acquise (Chamaillard et Desreumaux, 2004).

Si un micro-organisme réussit à traverser la barrière épithéliale physique, des molécules chimiotactiques sont relâchées par les cellules endothéliales ou les bactéries amenant ainsi le recrutement, au site d'infection, de cellules immunitaires les neutrophiles et les monocytes. Elles sont responsables de la phagocytose aboutissant d'une part à la destruction de l'agent pathogène, et d'autre part de la présentation d'antigènes microbiens par le Complexe majeur d'histocompatibilité CMHII (Borregaard *et al.*, 2010).

Les neutrophiles qui migrent au site d'infection contribuent à l'élimination des bactéries par leur effet bactéricide. L'attaque des neutrophiles s'accompagne d'inflammation et de dommages tissulaires, et si l'invasion microbienne perdure une inflammation chronique peut se développer et mener à la MC.

6.1.2. La réponse immunitaire acquise

Les lymphocytes B et T qui, lorsqu'ils sont activés, produisent des effecteurs : cytokines et anticorps. A l'inverse de la réponse innée, cette réponse est hautement spécifique et confère une immunité de longue durée. Les lymphocytes T naïfs (Th0) sont capables, après activation, de se différencier en lymphocytes Th1, ou en lymphocytes Th17 fortement impliqués dans la MC. Les lymphocytes Th1 provoquent la sécrétion de grandes quantités d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-12. Les lymphocytes Th17 jouent un rôle dans la pathogénèse de la MC (Bouladoux *et al.*, 2013).

La production de cytokines pro-inflammatoires et de cytokines anti-inflammatoires est déséquilibrée chez les patients atteints de MC (Figure 1) La production de cytokines par les lymphocytes Th1 et Th17 est augmentée tandis que les lymphocytes régulateurs sont inhibés et produisent des quantités plus faibles de cytokines anti-inflammatoires (IL10) chez les patients atteints de MC.

De même que la réponse immunitaire de Th1 aboutit à l'activation des macrophages et à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1, l'IL6 ou le TNF, responsable de l'inflammation chronique digestive (Matricon, 2010).

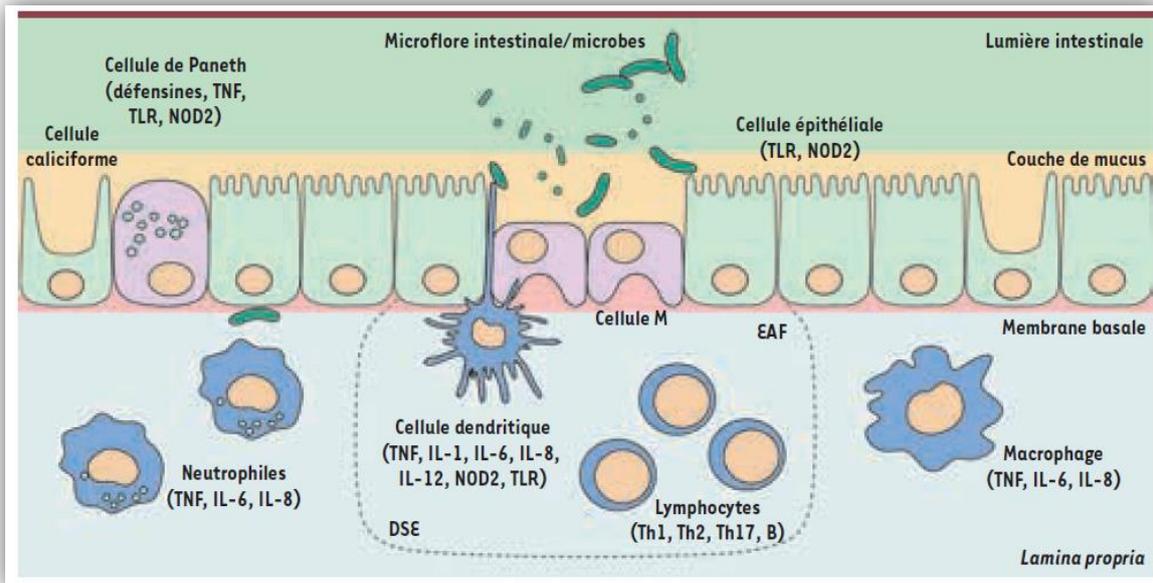


Figure 1 : Mécanismes de défense de la barrière épithéliale intestinale (Matricon, 2010).

Dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MC, les lymphocytes Th17 sont anormalement abondants et l'expression des cytokines associées est exacerbée (IL-21, IL-22). L'expression de l'IL-23, cytokine impliquée dans la mise en place de la réponse Th17, est également augmentée chez les patients atteints de MC. Cette polarisation du système immunitaire pointe l'IL-17 et l'IL-23 comme des cibles thérapeutiques potentielles en particulier dans la MC (Bouladoux *et al.*, 2013).

6.2. Facteurs environnementaux

6.2.1. Tabac

Le tabac est reconnu comme étant le facteur environnemental le plus important dans la MC, aussi bien au niveau de la prévalence que de la sévérité.

D'une part, le tabac 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 au non fumeurs (Jantchou *et al.*, 2006).

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 est exposé à un taux de récurrences cliniques et chirurgicales significativement plus élevé.

Etude bibliographique

Enfin, il est admis que l'effet négatif du tabac est modulé par le sexe et que les femmes seraient davantage affectées par les effets néfastes du tabagisme.

Deux théories permettent d'expliquer les effets délétères du tabac dans la MC. 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 entretiennent la réaction inflammatoire muqueuse. Leur action est normalement modulée par la présence d'antioxydants (vitamine C, β -carotène, α -tocophérol...), déficitaires chez le fumeur (Cosnes *et al.*, 2006)

6.2.2. 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 ayant été menées afin de mettre en évidence un rôle possible de l'alimentation dans l'étiologie de la MC. Cependant 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 (Andersan *et al.*, 2012).

6.2.3. 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 aigüe représente en réalité une forme d'entrée classique dans la maladie (Jantchou *et al.*, 2006).

6.2.4. Médicaments

La prise régulière d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens a été liée à la MC. Ces médicaments augmentent la perméabilité de l'épithélium et induisent une production de cytokines du fait d'une inhibition des prostaglandines (Frolkis *et al.*, 2013).

Etude bibliographique

Les antibiotiques ont été également incriminés, car ils favorisent un déséquilibre de la flore intestinale. Leur prise répétée dans l'enfance, en particulier les cyclines, est semble-t-il un facteur de risque de survenue d'une MC (Frolkis *et al.*, 2013).

Enfin, le rôle des hormones dans l'apparition et le développement de la maladie pourrait expliquer, de manière générale, la plus grande incidence de cette pathologie chez les femmes et un risque de survenue d'une MC augmenté chez les femmes sous contraception orale. Bien que, les résultats en faveur d'une telle corrélation soient contradictoires (Loftus, 2004).

6.2.5. Amélioration du 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 (Carbonnel *et al.*, 2009)

6.2.6. 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).

6.3. Facteurs 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 (Frolkis *et al.*, 2013) (Annexe 9).

III. Génétique de la maladie de Crohn

L'étude de plusieurs données épidémiologiques a permis, dans un premier temps, aux chercheurs d'émettre l'hypothèse d'une composante génétique de la maladie. En effet dans la MC on note :

- La présence d'un phénomène d'agrégation familiale, c'est-à-dire une augmentation supérieure des cas parmi les apparentés. Le risque de développer une MC pour les apparentés du premier degré (père, mère, frère, sœur, enfant) est 10 fois plus important que pour les apparentés du deuxième degré (oncle, tante, neveu, nièce) (Hugot *et al.*, 2001).
- Une concordance de la localisation et de l'évolution de la maladie entre les individus atteints, à l'intérieur d'une même famille (Desreumaux, 2005).
- Dans le cas des jumeaux homozygotes, un risque de développer une MC chez le deuxième jumeau est de 20 à 62% selon les études (Bonen *et al.*, 2003; Halfvarson *et al.*, 2003)
- une association de la MC à d'autres pathologies génétiquement déterminées telles que la pelvi-spondylite rhumatismale, le syndrome de Turner ou encore le syndrome de Hermansky-Pudlack (Hugot *et al.*, 2001).

Par la suite, une meilleure connaissance de l'architecture du génome humain, par son séquençage, a conduit à l'implication de plusieurs loci dans la MC, 71 à ce jour (Franke *et al.*, 2010) (Tableau 3). La réalisation d'études statistiques a abouti à la localisation chromosomique puis à l'identification de gènes de susceptibilité et à la mise en évidence de mutations (Annexe 10).

Etude bibliographique

Tableau 3. Principaux loci chromosomiques de susceptibilité pour les MICI (Matricon, 2010).

Marqueur génétique	Locus	Gènes candidats	Rôle(s) proposé(s) dans l'inflammation	Maladie associée	PMID
IBD1	16q12	NOD2/CARD15	Détection des composants bactériens cytosoliques	MC ; RCH?	11385576
IBD3	6p21.3	CMH HLA-DQA1, HLA-DRA, HLA-DRB5, HLA-DRB1 ; TNF	Détection des composants du non-soi ; régulation de l'inflammation	MC + RCH	10053016
IBD5	5q31	IL3, IL4, IL5, IL13	Régulation de l'inflammation	MC	10777714
IBD10	2q37.1	ATG16L1	Autophagie	MC	17200669
IBD12	3p21	MST1, BSN, GNAI2	Régulation de l'expression des médiateurs pro-inflammatoires	MC + RCH	11378820
IBD14	7q32	IRF5	Régulation de l'expression des médiateurs pro-inflammatoires	MC + RCH	17881657
IBD17	1p31.1	IL23R	Génération et maintenance des cellules Th17	MC + RCH	17447842
IBD19	5q33.1	IRGM	Autophagie	MC	17554261
IBD23	1q32	IL10	Régulation de l'expression des médiateurs pro-inflammatoires	MC + RCH	15937090

1. Gène *CARD15/NOD2*

La première étude « génome entier » pour la MC a été effectuée par Hugot *et al* en 1996, mettant en évidence une association entre une région péri-centromérique du chromosome 16 en q12 (*IBD1* : *Inflammatory bowel disease 1*) et la MC. Cette association fut ensuite confirmée par une large étude européenne (Curran *et al.*, 1998). Cette découverte fut la première confirmation moléculaire d'une contribution génétique à la MC. De nombreuses études ont, par la suite, largement validé cette association qui est spécifique de la MC. Une étude plus fine de la région IBD1 (Hugot *et al.*, 2001) a permis d'identifier le premier gène prédisposant à la MC appelé *NOD2*, rebaptisé par la suite *CARD15* (*Caspase Recruitment Domain*). Ce gène reste aujourd'hui le principal gène clairement associé à la MC,

1.1. Structure du gène *CARD15/NOD2*

Le gène *CARD15/NOD2* est retrouvé au niveau du locus IBD1. C'est un gène de taille moyenne qui comporte douze exons mais dont le premier exon alternatif n'est transcrit que dans une minorité d'ARN messagers. (Figure 2)

Des épissages alternatifs ont été rapportés mais la régulation de l'épissage du gène est aujourd'hui mal connue. L'ARN messager le plus long code pour une protéine de 1040 acides aminés. Cette protéine contient plusieurs domaines partagés avec d'autres protéines : un

Etude bibliographique

domaine N-terminal CARD, un domaine central NBD (*Nucléotide Binding Domaine*) et un domaine C-terminal riche en leucine LRR (*Leucine Rich Repeat*) (Hugot *et al.*, 2001).

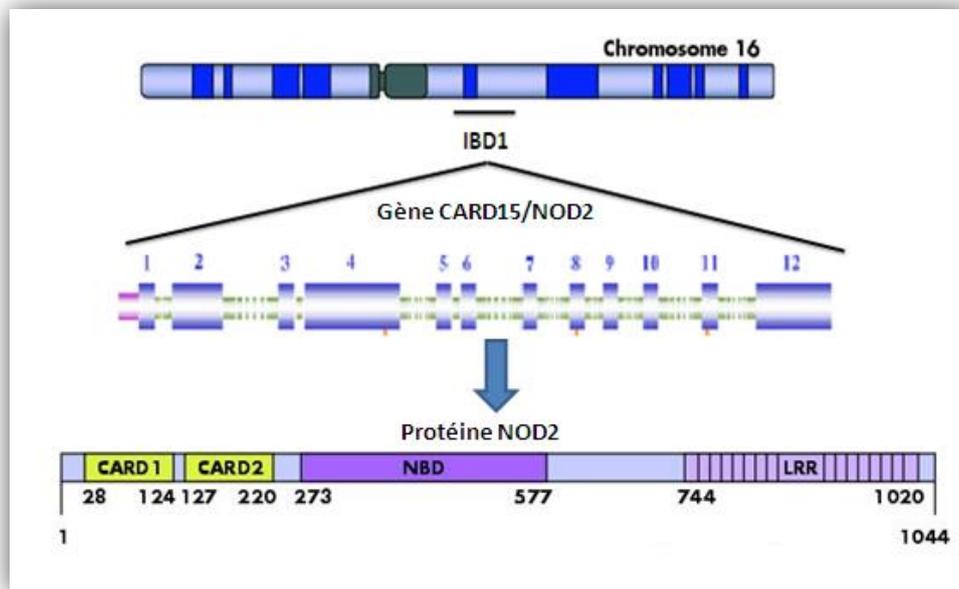


Figure 2 : Structure du gène *CARD15/NOD2* et de protéine NOD2/*CARD15* (Hugot *et al.*, 2002)

1.2. Ligand de la protéine *CARD15/NOD2*

La protéine *CARD15/NOD2* appartient à une famille de protéines, les PRR (*Pathogen Recognition Receptor*) impliquées dans la réponse immunitaire innée de l'hôte vis-à-vis des agents bactériens.

Le gène *CARD15/NOD2* code un récepteur intra-cytoplasmique de la famille des NLR (*NOD-like receptors*) impliqués dans la reconnaissance des molécules associées à des pathogènes (PAMP). Trois grandes familles retrouvées dans les PRR : les TLR (*Toll Like Receptors*) situés dans la membrane cellulaire, les RLR (*Retinoic acid inducible gene 1 Like Receptors*) et les NLR. Les NLR sont caractérisés par la présence d'un domaine LRR et d'un domaine NOD. Seul le domaine effecteur varie (Tanabe *et al.*, 2004).

Les PAMP sont des composants spécifiques du monde microbien, pas ou peu polymorphes, parmi lesquels on trouve le peptidoglycane (PGN) et le lipopolysaccharide (LPS) (Desreumaux, 2005).

NOD2 fait partie de la famille des NLR et reconnaît des molécules dérivées du PGN via son domaine LRR. Le PGN est présent chez la très grande majorité des bactéries où il intervient dans la rigidité de la paroi bactérienne. Il forme une enveloppe fine chez les bactéries à Gram négatif et une enveloppe épaisse chez les bactéries à Gram positif. Le PGN est formé de

Etude bibliographique

chaînes de composés glucidiques alternant un acide N-acétyl-muramique (MurNAc) et un N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) reliées par des peptides. CARD15/NOD2 reconnaît des produits de dégradation du PGN, dont le plus petit motif est le MDP, composé d'un acide N-acétyl-muramique et de deux peptides (Figure 3) (Girardin *et al.*, 2003).

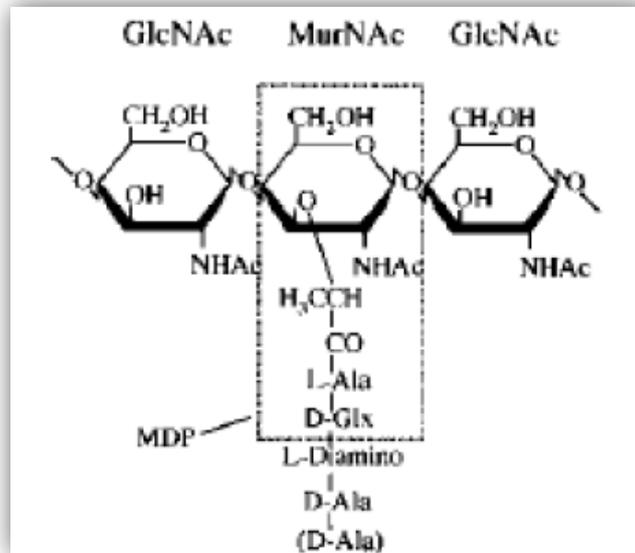


Figure 3 : Représentation schématique de la structure répétitive du PGN de la paroi des bactéries Gram-positives et Gram-négatives, dont le MDP est la signature minimale (Girardin *et al.*, 2003).

Dans les cellules épithéliales, la reconnaissance des PAMPs microbiens par les PRR, comme les TLR et les NLR, maintient l'homéostasie intestinale en stimulant l'expression des peptides antimicrobiens (AMPs), et en fortifiant les jonctions serrées. De plus, le signal induit par les PRR stimule la réponse anti-apoptotique. L'autophagie, induite par les signaux des PRR, agit en coopération avec les PRR pour augmenter la sécrétion des peptides antimicrobiens et des mucines. Ces mécanismes participent à la clairance bactérienne. Une mutation de l'un des acteurs peut donc induire un défaut de la fonction barrière intestinale, augmentant la translocation bactérienne et exacerbant la réponse inflammatoire (Figure 4).

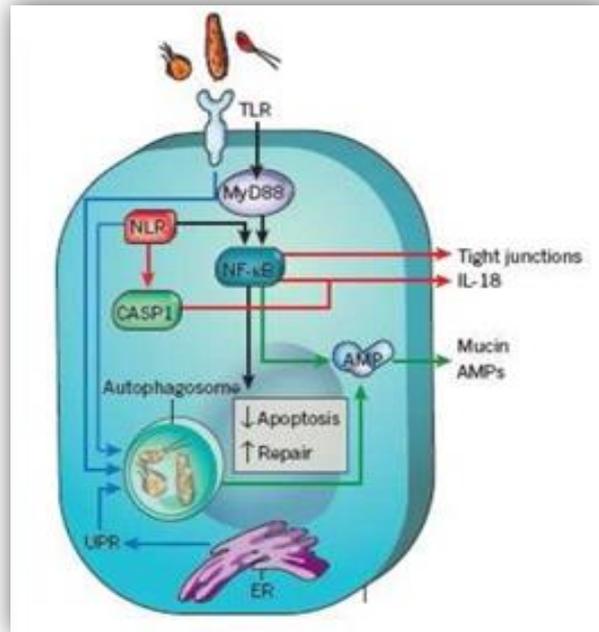


Figure 4 : Maintien de l'homéostasie intestinale et mécanismes de reconnaissance bactérienne par les cellules épithéliales intestinales (Maloy et Powrie, 2011)

1.3. Fonction de la protéine CARD15/NOD2

La protéine CARD15/NOD2 est synthétisée dans les cellules de la lignée monocyte/macrophage, cellules dendritiques, cellules de Paneth et cellules épithéliales de l'intestin (Desreumaux, 2005), elle fait partie d'un réseau protéique complexe. Suite à l'activation de la protéine CARD15/NOD2 par le MDP, le domaine CARD va former un complexe avec des protéines intra-cytoplasmiques. L'interaction la plus étudiée est celle de NOD2 avec Rip2 (*Receptor interacting protein 2*). Rip2 est une serine-thréonine kinase qui interagit directement avec le domaine CARD de NOD2. Cette interaction est indispensable à l'action pro-inflammatoire de NOD2 via le NF-κB. Le recrutement de Rip2 initie une cascade d'événements qui impliquent TAK1 (*TGF-β Activated Kinase 1*), IKKγ (*Inhibitor of nuclear factor κB Kinase γ*), IκB (*Inhibitor of nuclear factor κB*), activant les voies de signalisation NF-κB, MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) et JUNK (*JUN N-terminal Kinase*). Ces voies jouent un rôle central dans la sécrétion de molécules pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, TNF, CCL2, IL-5...) et anti-inflammatoires (IL-10) (Xavier et Podolsky, 2007).

En situation normale, la stimulation de CARD15/NOD2 par le MDP oriente plutôt la réponse immunitaire vers un profil Th2, caractérisé par l'expression de l'IL-5 et l'IL-4 (Magalhaes et al., 2008). Néanmoins, en situation d'infection aiguë par un pathogène intestinal, la stimulation de CARD15/NOD2 oriente la réponse immunitaire vers un profil Th17. L'axe

Etude bibliographique

NOD2/Th17 serait donc un élément central du contrôle des pathogènes intestinaux. CARD15/NOD2 est aussi exprimé au niveau des cellules de Paneth, où il participe à la synthèse des peptides antimicrobiens (Ogura *et al.*, 2003 ; Philpott *et al.*, 2014).

Une étude montre que la protéine CARD15/NOD2 possède une activité antibactérienne propre, via son interaction directe avec le MDP bactérien. In vitro le domaine LRR de NOD2 interagit directement avec la bactérie, altère son métabolisme et détruit l'intégrité de sa membrane plasmique. L'activité antibactérienne disparaît quand le gène *CARD15/NOD2* porte les mutations associées à la MC. CARD15/NOD2 est donc impliquée dans la reconnaissance et l'élimination des bactéries intracellulaires (Strober et Watanabe, 2011).

NOD2 intervient aussi dans d'autres mécanismes de défense contre les bactéries invasives. Des études montrent que l'activation de CARD15/NOD2 est indispensable au mécanisme de l'autophagie dans les cellules dendritiques et les macrophages. NOD2 participe notamment à la formation du phagosome suite à l'entrée d'une bactérie invasive dans la cellule (Cooney *et al.*, 2010).

CARD15/NOD2 serait impliqué dans la modulation des récepteurs bactériens TLR2, TLR3 et TLR4. Une étude sur modèle animal a montré que CARD15/NOD2 aurait un effet inhibiteur sur la voie des TLR en limitant la réponse inflammatoire enclenchée par la liaison du TLR2 à son ligand bactérien (Tsai *et al.*, 2011).

La stimulation de CARD15/NOD2 régulerait aussi l'expression du récepteur à l'IL-1 β , diminuant la réponse inflammatoire. Inversement, la stimulation chronique par l'IL-1 β diminuerait la tolérance induite par CARD15/NOD2. La stimulation de CARD15/NOD2 serait donc responsable de l'activation de l'inflammation en cas d'infection aiguë, mais induirait un phénomène de tolérance après une exposition prolongée à un organisme. La perte de cette tolérance due aux mutations du gène *CARD15/NOD2* pourrait expliquer l'hyperréactivité du système immunitaire inné vis-à-vis de la flore commensale dans la MC (Chamaillard et Desreumaux, 2004 ; Philpott *et al.*, 2014).

De plus, il semblerait que le récepteur CARD15/NOD2 ne soit pas impliqué uniquement dans la régulation de la flore intestinale, mais jouerait aussi un rôle dans le développement de cette flore. En effet, des souris invalidées pour *CARD15/NOD2* montrent une altération qualitative de la flore ainsi qu'une augmentation des taux microbiens des flores fécales et adhérentes, et cela à un stade précoce du développement. Les mutations de *CARD15/NOD2* pourraient donc affecter le développement de la structure du microbiote intestinal très tôt dans la vie (Rehman *et al.*, 2011).

Etude bibliographique

Enfin, CARD15/NOD2 semble aussi impliqué dans la croissance des cellules épithéliales. En effet, des cellules épithéliales invalidées pour le gène *CARD15/NOD2* ont montré une diminution de prolifération et une augmentation de l'apoptose. Ce défaut de croissance des cellules épithéliales pourrait contribuer aux lésions observées dans la MC (Maloy et Powrie, 2011 ; Strober et Watanabe, 2011) (Figure 5).

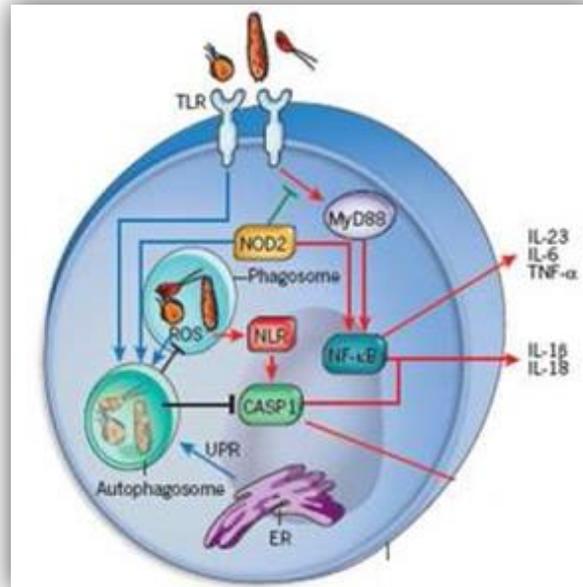


Figure 5 : Maintien de l'homéostasie intestinale et mécanismes de reconnaissance bactérienne par les cellules dendritiques ou les macrophages (Maloy et Powrie, 2011)

1.4. Spectre mutationnel dans la MC

Plus de 30 mutations de *CARD15/NOD2* ayant potentiellement un effet biologique ont été répertoriées. Elles se répartissent sur la plus grande partie du gène. La plupart d'entre elles sont rares et ne concernent qu'un petit nombre de malades (mutations privées). A l'inverse, trois mutations apparaissent fréquentes, ces mutations sont associées de manière indépendante à la MC et affectent la portion C-terminale de la protéine CARD15/NOD2.

Il s'agit des variants R702W, G908R et 1007fs qui représentent ensemble plus de 80% des mutations, la plupart des études ne portent en fait que sur ces trois variants (Hugot *et al.*, 2001).

- **R702W**: est une substitution de thymine en cytosine en position 2104 sur l'exon 4 et donne lieu à un changement de l'acide aminé Arginine en tryptophane en position 702 de la protéine.
- **G908R** : est une substitution de guanine en cytosine en position 2722 sur l'exon 8, et responsable d'un changement de glycine en arginine.

Etude bibliographique

- **1007fs** : est une insertion de cytosine en position 3020 résultant d'un codon stop, cette mutation générant une protéine tronquée de 32 acides aminés (Figure 6).

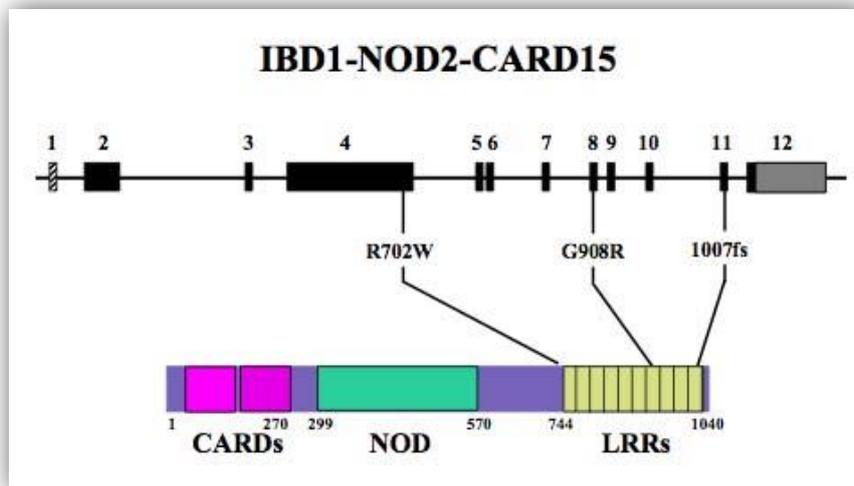


Figure 6. Sites mutationnelles du gène *CARD15/NOD2* (Hugot *et al.*, 2001).

Dans la MC, ces mutations sont présentes chez près de 30 à 40% des malades, donc deux fois plus souvent que chez les sujets sains. Ce chiffre monte à 50% chez les caucasiens, 15% des malades sont homozygotes ou hétérozygotes composites (Desreumaux, 2005 ; Riis *et al.*, 2007).

L'association entre la présence de mutations *CARD15/NOD2* et la MC a été établie par de nombreuses études dans des populations différentes. En l'absence de variant génétique fréquent identifié chez les asiatiques et les africains, la mutation du gène *CARD15/NOD2* n'est pas associée à la MC dans ces populations. Chez les caucasiens, les variations génétiques de *CARD15/NOD2* ne sont pas réparties de manière homogène. Ainsi, les mutations sont rares en Scandinavie mais fréquentes en Italie ou en Grèce (Riis *et al.*, 2007).

Au niveau individuel, le risque relatif de déclencher une MC lorsqu'on est porteur d'une des trois mutations principales dépend du nombre et de la nature des mutations. Les odds ratios (OR) de MC sont respectivement de 2, 3 et 4,6 pour les variants R702W, G908R et 1007fsinsC à l'état hétérozygote, alors qu'ils sont respectivement de 3,3, 12 et 35 pour les mêmes variants à l'état homozygote (Abraham et Cho, 2006 ; Pascoe *et al.*, 2007).

Ces mutations sont également présentes chez environ 15% des sujets sains. Ainsi, être porteur d'une mutation ne signifie pas être malade. Ce résultat était attendu dans le cadre d'une maladie génétique complexe telle que la MC puisque d'autres mutations sur d'autres gènes et

l'exposition à des facteurs environnementaux sont nécessaires pour que la maladie apparaisse (Desreumaux, 2005).

1.5. Rôle du *CARD15/NOD2* dans la MC

Il a été postulé par de nombreux groupes que les mutations de *CARD15/NOD2* entraînent une perte de fonction responsable de la maladie. Cependant cette perte de fonction apparaît paradoxale puisque la MC est une maladie inflammatoire. Ce dilemme n'est pas encore résolu complètement et plusieurs hypothèses physiopathologiques restent débattues (Corridoni *et al.*, 2014).

Il a été montré que *CARD15/NOD2* est principalement exprimé dans les leucocytes et en particulier dans la lignée monocyte-macrophage, ceci était logique du fait que la MC est une maladie inflammatoire par conséquent elle implique le système immunitaire. De plus la présence de granulomes dans la MC confirme cette hypothèse puisque à partir de la lignée monocyttaire se différencient les cellules épithélioïdes et géantocellulaires de ces granulomes. L'expression de *CARD15/NOD2* dans l'épithélium intestinal est limitée (Liu et Anderson, 2014 ; Rogler, 2007).

Une perturbation de l'immunité innée, via l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF ou l'IL-1 β est aussi imputée à la mutation du gène *CARD15/NOD2*, ainsi qu'un défaut de l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Philpott *et al.*, 2009).

De plus, des patients porteurs d'une mutation sur le gène *CARD15/NOD2* montrent une diminution de l'expression des défensines, des peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules de Paneth au niveau de l'iléon qui interviennent dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Une autre étude avance l'hypothèse que la diminution de l'expression des défensines est liée à l'apoptose des cellules de Paneth causée par l'inflammation intestinale (Hrnčířová *et al.*, 2014).

Une mutation de *CARD15/NOD2* entraînerait une diminution de l'autophagie, renforçant le défaut de clairance bactérienne. Ce défaut de clairance peut se traduire par une augmentation de la translocation bactérienne vers les ganglions mésentériques. En effet une augmentation de la translocation bactérienne, responsable de péritonite bactérienne, a été associée aux mutations de *CARD15/NOD2* chez des patients atteints de la MC (Glasser *et al.*, 2009).

La perte de fonction du domaine LRR due à la mutation 1007fsinsC empêcherait la reconnaissance du MDP par la protéine et donc préviendrait l'activation de la cascade NF- κ B.

Etude bibliographique

La perte de fonction conduirait aussi au blocage de la sécrétion des α -défensines (peptides antimicrobiens) par les cellules de Paneth (Hrnčířová *et al.*, 2014) (Figure 7).

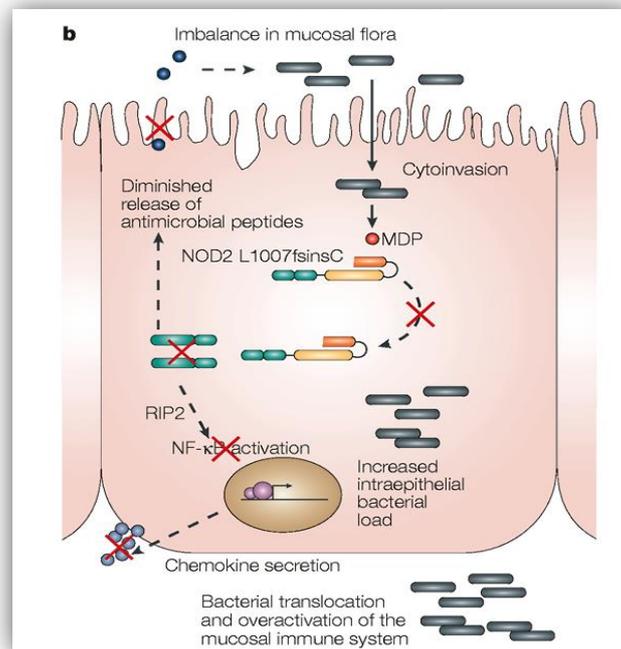


Figure 7 : Rôle du CARD15/NOD2 dans la MC (Nature Reviews Genetics, 2005)

1.6. Importance du génotype en pratique clinique

Selon Hugot *et al* (2006), l'analyse des mutations chez les malades indique que les sujets atteints de MC ont souvent deux mutations sur les allèles portés par les deux chromosomes. Il estime le risque relatif d'être malade à environ 20 à 40 fois plus élevé que dans la population générale alors que le même risque est de l'ordre de 2 à 3 pour les sujets porteurs d'une seule mutation.

Ce calcul du risque est important mais il est difficile de l'utiliser dans le cadre d'un conseil génétique s'adressant au malade ou à sa descendance car il dépend non seulement de *CARD15/NOD2* mais aussi de nombreux autres facteurs génétiques. Donc, ce risque est trop faible pour être utile seul en pratique clinique.

La valeur diagnostique du génotypage de *CARD15/NOD2* ne peut être utilisée à la place des outils diagnostiques classiques que sont la clinique, l'endoscopie, l'histologie, la biologie et la radiologie (Naser *et al.*, 2012, Ananthakrishnan *et al.*, 2014).

Etude bibliographique

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

Des mutations du gène *CARD15/NOD2* ont été observées non seulement dans la MC, mais aussi dans d'autres syndromes rare de transmission mendélienne comme :

- Le syndrome de Blau. Cette maladie est caractérisée par une inflammation granulomateuse pouvant toucher l'œil, la peau et les articulations. Les mutations observées dans le syndrome de Blau touchent le domaine NOD liant les nucléotides. Ces mutations entraînent une activation spontanée anormale de la protéine de type gain de fonction. Ces différences expliquent probablement les différences dans la topographie de l'inflammation et le mode de transmission de ces deux maladies granulomateuses. Le syndrome de Blau apparaît donc comme un modèle «en miroir» pour la MC (Hugot, 2006 ; Pillai et Sobrin, 2013).
- Les maladies granulomateuses comme la sarcoidose ou le syndrome de Wegener ou dans des maladies inflammatoires comme les spondylarthropathies, la polyarthrite rhumatoïde ou l'uvéïte.
- Il est intéressant de noter que les nouveaux gènes identifiés ces dernières années rapprochent eux aussi les MICI d'autres maladies pour lesquelles l'association clinique avec les MICI était connue ou non (Figure 8).

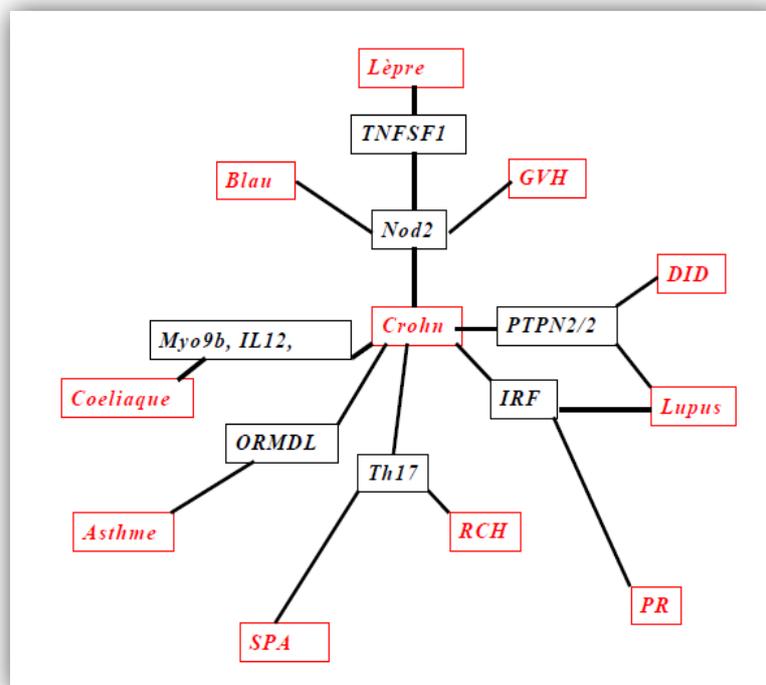


Figure 8 : Gènes de susceptibilité (en noir) communs à plusieurs maladies (en rouge) et formant un réseau de maladies. PR : polyarthrite rhumatoïde; SPA : spondyloarthropathies ; DID : Diabète insulino-dépendant. GVH : réaction de greffon contre l'hôte (Hugot, 2006).

2. Autres gènes candidats associés au développement de la MC

Le criblage du génome entier par étude d'association à l'aide de marqueurs. Ce système permet la détection de gènes de prédisposition à l'aide de cohortes de patients de l'ordre de quelques milliers.

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

- Le gène XBP1 (*X-Box Binding Protein 1*) codant un facteur de transcription impliqué dans le stress du réticulum endoplasmique et dont l'inactivation provoque l'apoptose des cellules de Paneth (Kaser *et al.*, 2008).
- Le gène codant NLRP3 (*NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3*), c'est un gène situé sur le locus 1q14 codant pour la cryopyrine intervenant dans les phénomènes de l'inflammation (Villani *et al.*, 2008).
- Certains gènes impliqués dans la réponse Th17 et des gènes codant pour le récepteur de la cytokine pro-inflammatoire IL-23, dont l'expression est augmentée dans la MC (Peyrin-Biroulet *et al.*, 2007).
- Les gènes *SLC22A4* et *SLC22A5* (*Solute carrier family 22, member 4 and 5*) qui codent pour des transporteurs de cations organiques : OCTN1 et OCTN2 (*organic cation transporter, novel*) exprimés dans de nombreux tissus, dont la barrière intestinale est capable d'expulser les toxines bactériennes. Les conséquences restent néanmoins débattues (Ma *et al.*, 2013).
- Le gène *HEATR3* (*HEAT Repeat Containing 3*) a été associé au risque élevé de la MC. il fait partie de la voie du NF- κ B (Zhang *et al.*, 2013).
- Les gènes *ATG16L1* (*Autophagy Related 16-Like 1*) et *IRGM* (*immunity-related GTPase*) codent pour des complexes protéiques jouant un rôle important dans l'autophagie, voie majeure du catabolisme lysosomal. L'autophagie permet le maintien dans la cellule de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des matériels cellulaires «usés», par l'intermédiaire de vacuoles appelées autophagosomes. Elle participe aussi activement à la réponse immunitaire à l'encontre des bactéries et des virus au niveau intracellulaire (Maev et Andreev, 2014).

La plupart des gènes de prédisposition à la MC sont donc impliqués dans la clairance des pathogènes cellulaires et dans l'immunité innée (Murthy *et al.*, 2014) (Figure 9).

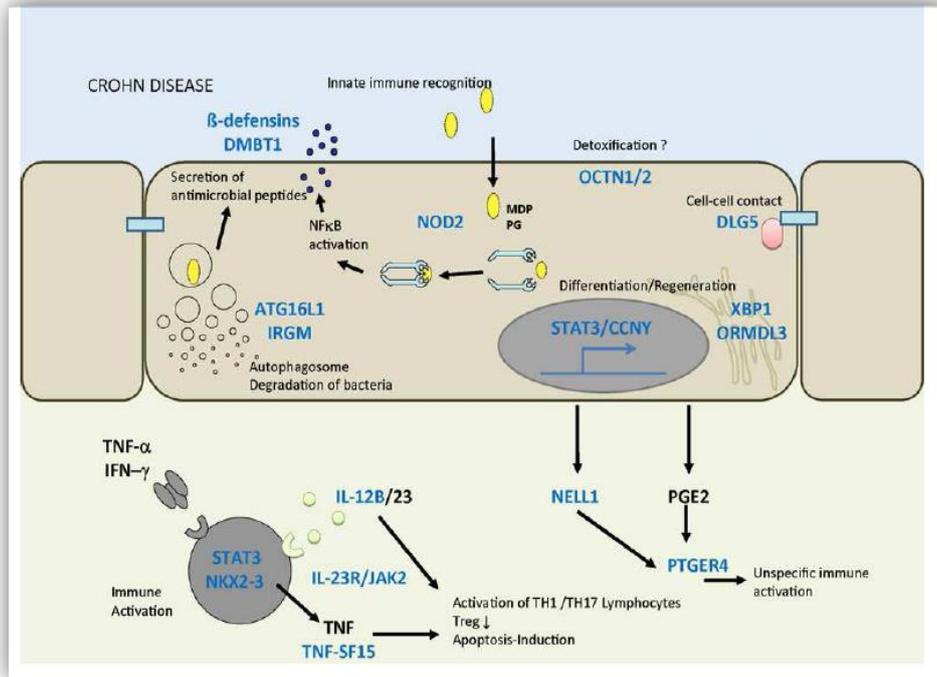


Figure 9 : Carte des risques moléculaires prédisposant à la MC. Le schéma résume une sélection d'associations génétiques récentes avec leur localisation et leur fonction supposées, pouvant être mutées dans la MC (Rosenstiel et Schreiber, 2009).

3. Pharmacogénétique

Les MICI, comme d'autres pathologies complexes, sont aujourd'hui le sujet de très nombreuses recherches génétiques et pharmacogénétiques.

Une étude récente a montré que la présence de mutation *CARD15/NOD2* influe sur la prise en charge thérapeutique. En effet, un plus grand pourcentage de patients porteurs de mutations *CARD15/NOD2* étaient réfractaires aux corticoïdes, mais répondaient bien à un traitement par immunosuppresseurs. A l'inverse, les patients porteurs du gène sauvage, étaient répondeurs aux corticoïdes et présentaient une meilleure réponse aux anti-TNF (Niess *et al.*, 2012).

L'IFX est un agent biologique, ciblant spécifiquement des molécules essentielles à l'inflammation, et reconnu dans le traitement de la MC. Cependant, environ 30% des patients traités ne répondent pas à ce traitement. Bien que l'IFX représente un apport important dans la prise en charge de la MC, un ciblage des individus répondeurs au traitement est indiqué étant donné son coût et sa toxicité potentielle. Les facteurs influençant cette réponse au traitement sont dès lors activement recherchés. La reproductibilité dans le temps de la réponse ou de la non-réponse au traitement chez un patient donné laisse à penser que des facteurs génétiques

Etude bibliographique

sont impliqués dans cette différence de réponse thérapeutique inter-individuelle (Medrano *et al.*, 2015).

Les progrès récents en biotechnologies, génétique et bioinformatique ont permis des avancées significatives dans ces domaines de recherche au cours de ces dernières années. La découverte des facteurs génétiques associés à ces pathologies et à leur thérapeutique s'accélère. Cependant, les retombées cliniques de ces recherches restent aujourd'hui limitées. Malgré tout, à l'heure actuelle le génotypage systématique n'est pas recommandé (Bourgain, 2014).

Méthodologie

I. Patients et témoins

1. Recrutement des patients

Notre étude a inclus 103 patients atteints de la MC. Le recrutement des patients est réalisé par les médecins spécialistes et au niveau de deux régions, la première au niveau du service d'Hépatogastro-entérologie au Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Benbadis de Constantine, la deuxième au niveau de la wilaya de Batna au service de médecine interne au CHU Benflis Touhami, et à la polyclinique de Douar Eddiss de façon hebdomadaire. Une enquête épidémiologique a été réalisée pour tous les patients recrutés (Annexe 11).

Ce recrutement est basé sur le diagnostic positif qui est réalisé par le médecin traitant. Le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments cliniques, endoscopiques, radiologiques, anatomo-pathologiques et évolutifs. Le diagnostic différentiel se pose, essentiellement, sur la tuberculose intestinale, RCH et les cancers intestinaux.

Les patients ont bénéficié d'un prélèvement sanguin sur deux tubes d'EDTA (*Ethylene-Diamin_tetra-acetic Acide*), après avoir reçu des explications sur les procédures et les objectifs de l'étude, et après avoir signé un consentement éclairé (Annexe 12).

Notre étude s'est étendue du mois d'Avril 2011 à Juin 2014, la sélection de ces patients a été faite en respectant des critères bien définis.

➤ Critères d'inclusion

Un ensemble de critères d'inclusions a été retenu pour le groupe d'étude (patients et témoins), à savoir :

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

➤ Critères d'exclusion

- RCH : recto colite ulcéro hémorragique
- Colites inclassables

2. Recrutement des témoins

Les témoins sont recrutés à partir d'une population prise au hasard, supposée saine, leurs âges s'échelonne de 16 à 75 ans, leurs ADN constituent un pool stocké au sein du laboratoire. Nous avons recruté 144 témoins des deux sexes (67 hommes et 77 femmes).

- **Critères d'inclusion** : tout sujet sain de différents âges.
- **Critères d'exclusion** : les sujets présentant des antécédents personnels ou familiaux de la MC.

3. Prélèvement sanguin

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

- L'accord du patient et l'obtention de son consentement sont obligatoires.
- Le prélèvement est effectué dans un tube EDTA vacutainer, 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.

II. Méthodes expérimentales

Nous avons utilisé la technique de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism*) qui nécessite une succession d'étapes méthodologiques: extraction de l'ADN, contrôle qualitatif et quantitatif de l'ADN, la PCR suivie de la digestion enzymatique (RFLP) pour évaluer le polymorphisme du gène et finalement l'analyse des produits de digestion par électrophorèse sur gel d'agarose.

1. Extraction de l'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 (Annexe 13).

Méthodologie

Principe :

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.

1.1. Estimation qualitative d'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 \Rightarrow l'ADN est suffisamment pur.
- Si le rapport $DO_{260}/DO_{280} > 2 \Rightarrow$ l'ADN est contaminé par les ARN.
- Si le rapport $DO_{260}/DO_{280} < 2 \Rightarrow$ l'ADN est contaminé par les protéines.

L'ADN pur est conservé à -20°C jusqu'à utilisation, et dans le cas de contamination, une réextraction est nécessaire pour un bon usage.

1.2. Estimation quantitative d'ADN

La concentration de l'ADN est calculée selon la formule :

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

En prenant en considération que l'ADN obtenu est dilué à 1/100, la quantité obtenue est multipliée par 100. La concentration est rapportée au facteur de dilution.

La concentration de l'ADN en $\mu\text{g}/\text{ml}$ = facteur de dilution x DO 260 x 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
--

2. Génotypage du gène *CARD15/NOD2*

Pour la mise en évidence des polymorphismes R702W, G908R et 1007fs du gène *CARD15/NOD2*, nous avons utilisé la technique de PCR-RFLP qui consiste à réaliser les étapes suivantes :

- Amplification par PCR.
- Une migration électrophorétique sur gel d'agarose pour le contrôle du produit de PCR.
- Digestion du produit de PCR par une enzyme de restriction spécifique pour chaque polymorphisme (Tableau 4).
- Une migration électrophorétique sur gel d'agarose pour la séparation des produits de digestion.

Tableau 4 : Les amorces et la taille du produit de PCR pour les trois polymorphismes du gène *CARD15* (Forward=F=brin sens, Reverse=R=brin antisens)

Mutation	Séquences des amorces	Taille du fragment amplifié en pb
R702W	5'TCA GCC TGA TGA CAT TTC3' 5'CGG GAT GGA GTG GAA GT3'	449
G908R	5' CAC TGA CAC TGT CTG TTG ACT C 3' 5' AAG ACC TTC ATA AGT GGC CCC 3'	163
1007fs	5'CCT CAA AAT TCT GCC ATT CC3' 5'GGC AGA AGC CCT CTG CAG GGC G3'	151

2.1. Amplification par PCR

La méthode de PCR permet d'amplifier des séquences d'ADN cibles, définies (l'amplicon) en plusieurs millions d'exemplaires. Un cycle d'amplification est composé de trois étapes : dénaturation, hybridation et élongation.

- **La dénaturation :** Cette phase consiste à séparer les deux brins d'ADN. La température de la dénaturation est comprise entre 92°C et 95°C. A cette température, les liaisons

Méthodologie

hydrogènes se dissocient et les ADN double brins se séparent en ADN simple-brins (ADN monocaténares).

- **L'hybridation:** s'effectue à une température de 50°C à 70°C. Cette température d'hybridation est un paramètre important pour la réussite de la PCR et doit être calculée en fonction du T_m (Température de fusion ou *Melting temperature*) des deux amorces. Cette diminution de la température permet aux liaisons hydrogènes de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider.
- **L'élongation:** Elle s'effectue à une température de 72°C. A cette température, la Taq polymérase se lie aux ADN monocaténares amorcés et catalyse la réplication en utilisant les déoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) présents dans le mélange réactionnel.

2.1.1. Réactifs utilisés pour la PCR

- **Les enzymes :** L'enzyme Taq DNA Polymérase (biomatik) est utilisée à une concentration de 5 U/μl. La Taq-polymérase 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 de la Taq «biomatik » nommé 10X PCR Buffer est composé de : 200 mMTris-HCl, pH 8.4.
- **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. Nous avons utilisé un mix de dNTP 4X5 μm (Eurobio). La concentration de la solution stock est de 25mM pour chaque base. La concentration finale de chaque base dans la réaction de PCR est de 0,2.
- **Le MgCl₂ :** 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 (Biomatik).

Méthodologie

2.1.2. Protocole de la PCR

La réaction de PCR se déroule selon trois étapes à des températures différentes de façon cyclique. L'ensemble s'effectue une trentaine de fois.

La préparation du mélange réactionnel de la PCR (QSP 25µl) est réalisée avec des quantités précises pour chaque réactif (Tableau 5) :

Tableau 5 : Composants du mélange réactionnel de PCR pour trois polymorphismes

Mix	Vol (µl)/tube de PCR
H2O	16,6
MgCl2 à 1,5 final (25mM)	1,5
Amorce sens (100 ng/µl)	0,5
Amorce anti-sens (100 ng/µl)	0,5
Tampon 10X	2,5
dNTP 2mM final	2
Taq DNA 5U/µl	0,4

Après la préparation du mélange réactionnel de la PCR, nous avons pris 24 µl de ce mélange avec 1µl d'ADN pour chaque tube. Le déroulement des cycles de la PCR a été réalisé par un thermocycleur (eppendorf) et les conditions d'amplification étaient identiques pour les trois polymorphismes selon le processus suivant :

- **La dénaturation initiale:** 94°C pendant 5 minutes.
 - dénaturation à 94°C pendant 30 secondes,
 - une hybridation à 61,8°C pendant 30 secondes
 - et une élongation à 72°C pendant 30 secondes.
- **L'élongation finale :** 72°C pendant 7 minutes.

} 30 cycles

Méthodologie

2.2. Contrôle des produits PCR

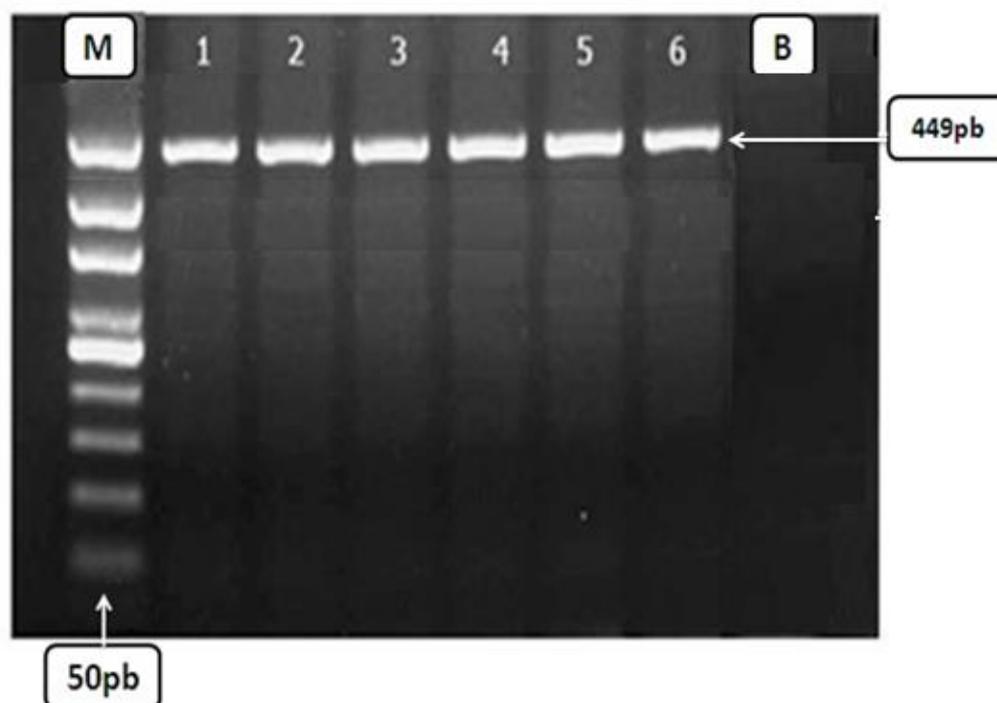
Ce contrôle est réalisé par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% additionné de 10 μ l du BET (bromure d'éthidium). Le gel est déposé sur une plaque d'une cuve horizontale (Annexe 14).

Dans chaque puits du gel, nous déposons 10 μ l d'amplifiat en présence de 3 μ l du colorant Bleu de Bromophénol (BBP) qui permettent de suivre le front de migration.

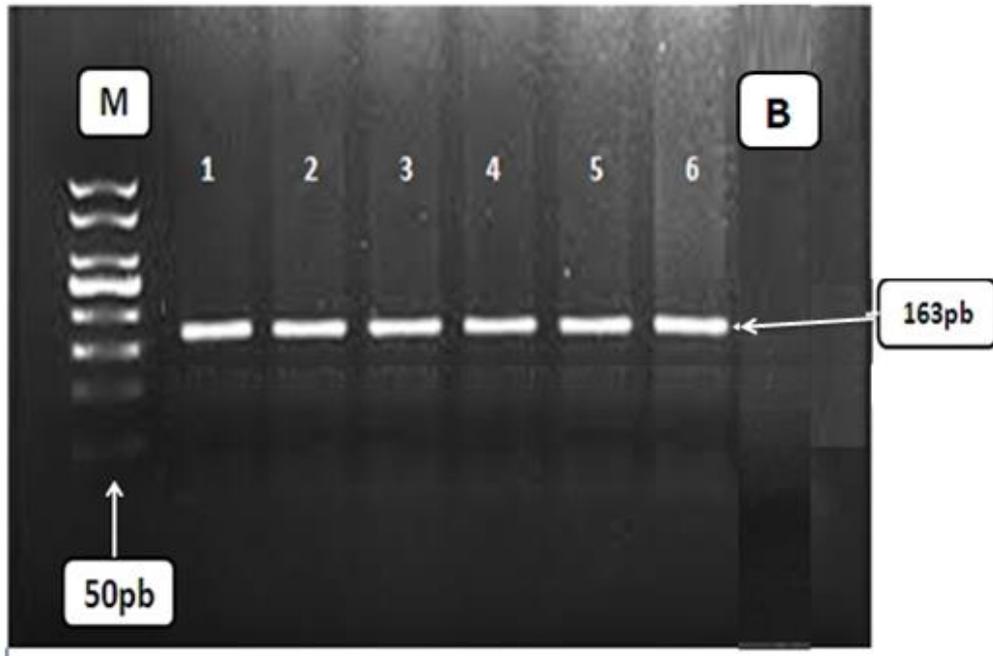
Parallèlement, un échantillon sans ADN (blanc) est inclus dans la série à amplifier et sert de contrôle négatif (témoin de contamination). Le dépôt se fait du côté de la cathode et le système est soumis à une migration sous un courant de 100 volts pendant 30 minutes.

Après la migration, la visualisation des bandes est effectuée sous rayons UV et révélés par une coloration au bromure d'éthidium. Le gel est photographiable et permet de visualiser les fragments amplifiés sous forme de bandes fluorescentes de même taille. Ce contrôle permet aussi de vérifier si une éventuelle contamination de l'ADN est survenue au cours de PCR grâce au puits contenant le blanc.

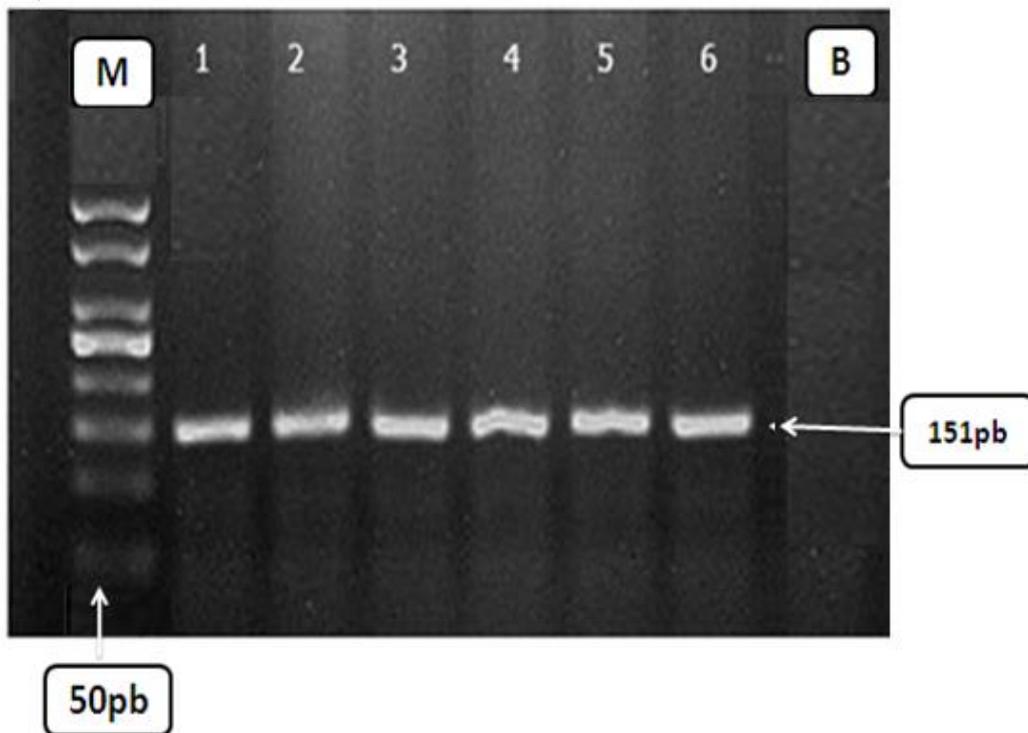
les photographies 1, 2 et 3 représentent les profils d'électrophorèse pour les trois polymorphismes du gène *CARD15/NOD2*.



Photographie 1 : Profil de migration électrophorétique des produits de PCR du polymorphisme R702W



Photographie 2 : Profil de migration électrophorétique des produits de PCR du polymorphisme G908R



Photographie 3 : Profil de migration électrophorétique des produits de PCR du polymorphisme 1007fs

2.3. Digestion des produits PCR

Les fragments d'ADN amplifiés sont soumis à une digestion enzymatique clivant les molécules à des endroits précis appelés sites de restriction. Toute modification par mutation dans la séquence du site de restriction pourrait entraîner ou empêcher l'action de l'enzyme. Ces modifications de l'ADN sont détectées par des variations du nombre et de la longueur des fragments de restriction obtenus après digestion enzymatique (Tableau 6).

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

Tableau 6 : Génotypage du gène *CARD15/NOD2*

Mutation	Enzyme de restriction	Génotypage	Longueur du fragment en pb
R702W	MspI (Thermo Scientific, 10 U/µL, 3000 U)	Hétérozygote CT Homozygote muté TT	329, 66 et 54 329, 66, 54 et 120 329 et 120
G908R	HhaI (Promega, 1,000u)	Hétérozygote GC Homozygote muté CC	163 27, 136 et 163 27 et 136
1007fs	ApaI (thermo scientific, 10 u/µL, 5000 u)	Heterozygote Homozygote mute	151 20, 131 and 151 20 and 131

2.4. Electrophorèse des produits de la digestion

Les fragments d'ADN digérés par l'enzyme de restriction sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 3%. Elle se fait exactement dans les mêmes conditions et de la même façon que l'électrophorèse effectuée pour le contrôle des produit de la PCR durant 1heure. Le gel est visualisé par transillumination aux UV.

3. Etude statistique analytique

Les calculs statistiques de tous les échantillons obtenus ainsi que de tous les paramètres considérés ont été obtenus par le logiciel Epi info version 6.0. L'étude statistique est basée sur l'évaluation d'un odds ratio (OR) et des p- value.

Méthodologie

- **Calcul de l'OR:** Pour réaliser ce calcul, nous avons établi un tableau de contingence (Tableau 7).

Tableau 7 : Tableau de contingence

	Patients	Contrôles	Total
Présence du facteur présumé de risque de maladie	A	B	A+B
Absence du facteur présumé de risque de maladie	C	D	C+D
	A+C	B+D	A+B+C+D

L'intensité de l'association entre le polymorphisme et la présence de la MC est calculée comme suit : $OR = \frac{A * D}{B * C}$

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

- **Le choix de la p- value**

Le seuil critique est évalué à 0,05 (risque α). Si la valeur de p-value calculée à posteriori est inférieure à ce seuil, la différence entre les paramètres est déclarée statistiquement significative.



Résultats et Discussion

I. Caractéristiques principales des patients

1. Age

La moyenne d'âge de nos patients est de $33,05 \pm 12,10$ avec des extrêmes allant de 15 à 67 ans (Tableau 8). Ceci confirme que la MC touche les individus les plus jeunes.

Tableau 8 : Répartition des patients par tranche d'âge

Tranche d'âge	Effectif (n)	Pourcentage (%)
10-19	6	5,82
20-29	45	43,70
30-39	29	28,16
40-49	10	9,70
50-59	7	6,80
60-69	6	5,82
Total	103	100

Dans notre étude le pic est compris entre 20 et 30 ans avec un âge moyen comparable à celui des autres séries (Tableau 9).

Concernant les études qui ont été réalisées dans notre pays, le pic d'incidence de la MC était de 21,21 dans la tranche d'âge de 35-39 ans chez la population étudiée par Hammada et al en 2011, alors qu'une autre étude a révélée un pic entre 20-30 ans, comme dans notre cas et un deuxième après 50 ans (Balamane *et al.*, 2013).

Dans les pays du Maghreb (Tunisie et Maroc) et en Espagne, l'âge moyen des patients est similaire à celui de notre population, alors qu'en Italie et en Australie, il a été observé une valeur supérieure.

Les études effectuées sur les populations saoudienne et égyptienne montrent un âge proche de notre étude (Azzam *et al.*, 2012 ; Kassem *et al.*, 2014).

Résultats et discussion

Tableau 9 : Age moyen selon certaines études

Auteurs	Pays	Année	Age moyen (ans)
De Diego et al	Espagne	2006	33,5 ± 13,3
Rigoli et al	Italie	2008	43,5 ± 10,7
Derakhshan et al	Iran	2008	36,6± 14,1
Zouiten-Mekki et al	Tunisie	2009	35
Gazouli et al	Grèce	2010	28,99 ± 14,22
Elazzaoui et al	Maroc	2012	35,4 ± 11,4
Azzam et al	Arabie Saoudite	2012	30,43 ± 10,20
Bhullar et al	Australie	2014	43,3
Kassem et al	Egypte	2014	30±12,1
Daoui et al	Algérie	2016	33,05±12,10

2. Sex-ratio

Dans notre série, nous notons une légère prédominance féminine avec 58 femmes et 45 hommes soit un sex-ratio de 1,28 (58 F/45 H). Dans la plupart des études réalisées précédemment, une prédominance de la MC chez les femmes adultes a été également constatée (les femmes ont 20 à 30 % plus de risque d'avoir une MC que les hommes).

Cependant, les hommes étaient plus touchés que les femmes dans des zones à faible incidence, tel que le Japon et la Chine. Ceci est expliqué en partie par l'importance du tabagisme dans ces pays (Leong *et al.*, 2003). Dans les zones à moyenne et à haute incidence, la MC touche surtout les femmes (Loftus, 2004 ; Burisch et Munkholm, 2013). En 2009, Economou et al ont publié une étude sur la région nord-ouest de la Grèce, qui a rapporté une homogénéité de l'apparition de la MC dans les deux sexes (Tableau 10).

Résultats et discussion

Tableau 10 : Sex-ratio selon certaines séries.

Auteurs	Pays	Année	n	Sex-ratio	MC
Leong et al	Chine	2003	65	M/F	2,82
Arnott et al	Irlande	2004	113	M/F	2,13
Zouiten-Mekki et al	Tunisie	2005	130	F/M	1,36
Baptista et al	Brésil	2008	187	M/F	1,01
Tekin et al	Turquie	2009	45	M/F	2,46
Gazouli et al	Grèce	2010	364	F/M	1,04
Hammada et al	Algérie	2011	299	F/H	1,11
Azzam et al	Arabie Saoudite	2012	46	M/F	2,06
Hama et al	Maroc	2012	101	F/H	1,4
Daoui et al	Algérie	2016	103	F/H	1,28

3. Age et sex-ratio

Il est à noter que dans notre série, les femmes étaient plus jeunes que les hommes avec des moyennes de $31,81 \pm 11,73$ ans pour les femmes et de $34,64 \pm 12,51$ ans pour les hommes (Figure 10).

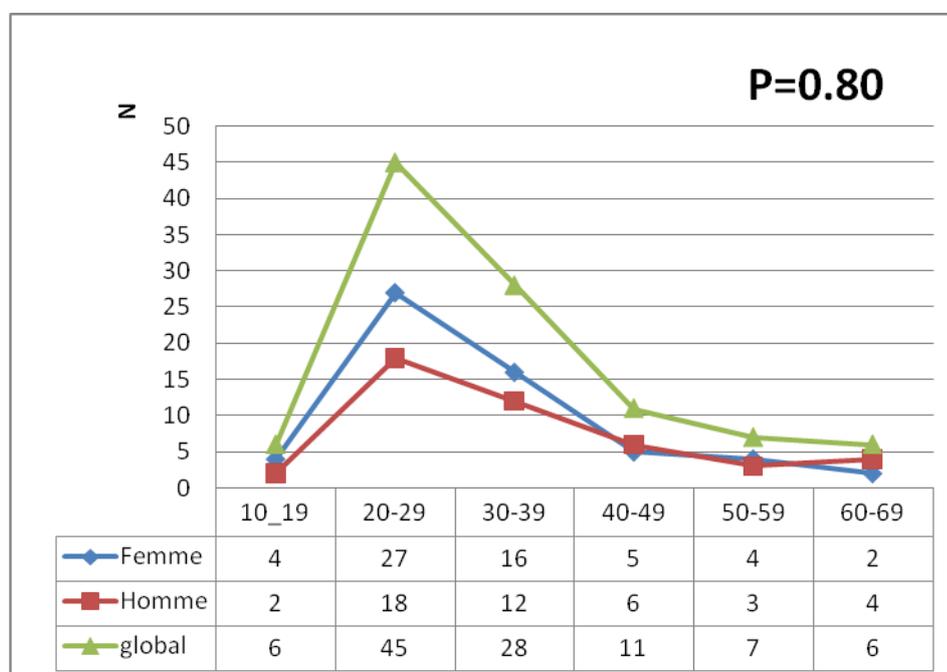


Figure 10 : Répartition selon l'âge et le sexe

Résultats et discussion

Le pic d'incidence pour la MC se situe dans la même tranche d'âge dans les deux sexes (Hivananda *et al.*, 1996 ; Leroubours *et al.*, 2007 ; Economou *et al.*, 2009). Dans notre série, le pic d'âge ainsi que l'âge moyen des femmes est inférieur à celui des hommes, cette différence peut être expliquée par l'augmentation des formes pédiatriques prédominantes chez les femmes. Cette prédominance féminine, même discrète, concerne spécifiquement les femmes très jeunes, ce qui peut suggérer l'implication des facteurs hormonaux endogènes ou exogènes dans l'expression de la MC. Ces données sont illustrées par plusieurs études, entre autres, l'étude d'Arnott *et al.* (2004) en Irlande où le nombre de femmes jeunes est deux fois plus important que celui des hommes.

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

Une autre étude sur la population Algéroise conclut qu'il ya une très légère prédominance féminine avec un sex-ratio de 1,05 et un pic d'âge entre 29-30 ans, alors que le pic d'âge est observé entre 20-29 ans chez les hommes (Balamane *et al.*, 2013).

Dans une étude réalisée au Maroc, le sexe féminin est prédominant avec un sex-ratio F/Mde 1,57, alors que l'âge moyen des hommes était significativement plus élevé que celui des femmes qui est respectivement de 35,7+/-12,9 ans, et de 32,3+/-10,3 ans ($p= 0,02$) avec des pics de fréquence différents et statistiquement significatifs respectivement entre 20-30 ans et 30-40 ans ($p=0,005$) (Elazzaoui, 2012).

Selon le registre Epimad (Registre des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin), la MC chez les patients de moins de 17 ans représente environ 15%, et l'incidence chez l'enfant, comme le montrent certaines études, continue à augmenter, ce qui se répercute sur la population générale, par une augmentation de sa prévalence (Chouraki *et al.*, 2011).

Par exemple, selon une étude française, l'incidence des formes pédiatriques de la MC a augmenté, passant de 3,5/100000 habitants entre 1988 à 1990 à 5,2 (+48%) entre 2003 à 2005, ce qui oriente vers une stimulation persistante de l'environnement sur l'émergence de la MC chez les enfants (Vernier–Massouille *et al.*, 2008).

4. Répartition géographique de nos patients

Les patients qui ont été inclus dans cette étude proviennent de cinq régions géographiques différentes (Centre, Est, Ouest, littoral méditerranéen, Sud) et de 12 villes de l'Algérie (Tableau 11).

Tableau 11 : Répartition des patients selon les régions et villes d'Algérie

Ville	Nombre de patients
Batna	47
Constantine	19
Skikda	05
Biskra	03
Mila	06
Khenchla	05
Oum el Bouaghi	07
Djelfa	01
Jijel	04
Souk Ahras	04
Oran	01
M'sila	01

Selon cette répartition nous avons observé que le recrutement le plus important a été réalisé au CHU de Batna qui regroupe les villes de Khenchla et Biskra.

Dans notre série, 70,87 % de nos patients sont d'origine urbaine (n=73). Cette évaluation ne reflète probablement pas la réalité du fait que notre échantillon est faible, bien que Hammada et al (2011) constatent que 88% de leurs patients sont d'origine urbaine. De même dans une population marocaine 83,7% des patients sont également d'origine urbaine. Ce taux spécifique des sites urbains peut être expliqué par les facteurs environnementaux tels que les habitudes alimentaires, l'hygiène et le stress (Elazzaoui, 2012).

Les études menées à travers le monde se sont intéressées à l'analyse par régions et ethnies, comme le montre l'étude de Kappelman et al (2007) , selon laquelle la MC est plus fréquente dans les populations de race blanche, rare chez les noirs et exceptionnelle chez les Asiatiques.

Résultats et discussion

De faibles prévalences ont ainsi été constatées aux Etats-Unis, dans les groupes d'indiens d'Amérique du Nord, les noirs américains, les migrants latino-américains, les Maoris et les asiatiques (Vernier *et al.*, 2005).

Chez les juifs vivants en dehors d'Israël, la prévalence de la MC varie beaucoup d'un pays à l'autre, mais elle est toujours plus élevée chez les non-juifs. Cette prévalence est parallèle à celle de la population générale : dans des zones où la prévalence est déjà élevée (comme à Malmö en Suède), elle est aussi plus élevée chez les juifs vivant dans cet environnement que chez les juifs vivant dans une zone géographique où la prévalence est initialement basse (comme au Cap en Afrique du Sud). Dans des études plus récentes, la prévalence de la MC en Israël tend à augmenter, en particulier chez les secondes générations, c'est à dire les juifs nés de parents ayant immigrés en Israël. Par contre la MC est beaucoup plus rare chez les arabes vivant en Israël (Loftus, 2004). Ainsi, les groupes ethniques ne se distinguent pas seulement par leur patrimoine génétique, mais aussi par de nombreux facteurs d'origine socio-culturelle (Cortot *et al.*, 2009).

5. Statut tabagique

Le tabac est reconnu comme étant le facteur environnemental le plus incriminé dans la MC, aussi bien au niveau de la prévalence que de la sévérité.

Nous avons trouvé que 40,78% des patients sont des fumeurs, on remarque aussi que tous ces patients sont des hommes qui ont déjà fumé ou fumaient au moment du recrutement.

Dans notre société le tabac étant une habitude toxique plutôt masculine, son effet ne peut être prospecté correctement sur les femmes algériennes., cela peut représenter un biais dans notre enquête. De même que la prise de tabac à chiquer n'a pas été évaluée dans notre échantillon. Dans notre série, le pourcentage des fumeurs est expliqué probablement par l'absence de tabagisme dans la population féminine prédominante et ou bien un tabagisme inavoué.

La population marocaine, voisine de notre pays, présente un pourcentage de patients fumeurs très faible (14%), la même observation est signalée chez la population saoudienne, alors que les études qui ont été réalisées en Grèce, en Allemagne et en France trouvent une fréquence très proche de nos résultats (Tableau 12).

Résultats et discussion

Tableau 12 : Fréquences des patients fumeurs dans certaines études

Auteur	Pays	Année	Fréquence des fumeurs
Tekin et al	Turquie	2009	57,77
Helio et al	Finlande	2009	83,83
Gazouli et al	Grèce	2010	51,10
Bounab et al	Algérie	2011	24,8
Azzam et al	Arabie Saoudite	2012	15,2
Elazzaoui	Maroc	2012	13,7
Niess et al	Allemagne	2012	50,81
Jung et al	France	2012	54,7
Daoui et al	Algérie	2016	40,78

Chez les fumeurs, le risque relatif de développer une MC est de 2 fois plus élevé que chez les sujets n'ayant jamais fumé (Cortot *et al.*, 2009). Ce risque semble dépendre de la quantité de cigarettes consommée .50 à 60 % des patients sont des fumeurs, ce qui est supérieur au pourcentage de fumeurs dans une population adulte appariée (Carbonnel *et al.*, 2009).

Par ailleurs, dans les familles où les deux types de MICI (MC, RCH) sont présentes, la MC survient presque toujours chez les fumeurs et la RCH surtout chez les abstinents. Dans ce cas le tabac oriente l'expression phénotypique (Bernstein, 2009).

6. Antécédents familiaux

Dans notre cohorte, 29 patients avaient au minimum un antécédent familial soit une fréquence de 28,1 %, parmi lesquels 17 cas avaient un apparenté de Crohn, 7 cas avaient un apparenté de colite indéterminée, et 5 cas d'apparenté de RCH. Parmi les patients, 33,98% des patients sont issus d'un mariage consanguin.

Pour la plupart des auteurs, 8 à 10% des sujets atteints de MC ont un ou plusieurs parents, tous liens de parenté confondus, atteints de MC. De larges fluctuations (allant de moins de 4% à plus de 20%) ont été publiées et peuvent être en partie expliquées par des différences méthodologiques. Il semble toutefois que la proportion de formes familiales soit plus élevée si le cas index est un enfant (Elazzaoui, 2012).

Nos résultats sont similaires à ceux d'une étude algérienne (Meddour *et al.*, 2014), espagnole (De Diego *et al.*, 2006) et une étude française (Jung *et al.*, 2012).

7. Aspect cliniques: résultats

7.1. Manifestations générales

Une altération de l'état général accompagne souvent les poussées de la MC, l'amaigrissement est noté chez tous les patients, mais elle est variable selon l'intensité de la maladie, la fièvre est présente chez 43,69%, l'anémie est confirmée par un examen biologique (FNS) chez 41,75% des patients. Le retard de croissance est un symptôme qui est spécifique pour les patients ayant les premiers symptômes de la MC à un âge précoce (Vernier *et al.*, 2005). Dans notre échantillon, quatre jeunes patients présentent un retard staturo-pondéral (3,88%).

7.2. Manifestations digestives

Dans la majorité des cas le principal symptôme est une douleur abdominale (75,73%) qui s'accroît après les repas, accompagnée de diarrhées chroniques avec ou sans rectorragie (40,77%), et des signes ano-périnéaux observés chez 25,24% des patients. Selon Azzam et al (2012), les douleurs abdominales sont observées chez 86,4%, la diarrhée est présente chez 75%, et les signes ano-périnéaux sont diagnostiqués chez 43,2% des patients.

7.3. Manifestations extra-intestinales

Outre les manifestations intestinales de la MC, 41,7% des malades présentent des manifestations extra-intestinales dont :

- les manifestations ostéo-articulaires sont les plus fréquentes (79,07%). Les atteintes articulaires périphériques évoluent en général parallèlement aux poussées digestives. Elles touchent une ou plusieurs articulations (genou, cheville, coude, poignet, doigts) souvent présentant un tableau d'arthrite aiguë avec des signes inflammatoires locaux et des douleurs.
- Chez nos patients les manifestations mucocutanées (18,60%) sont représentées par les aphtes buccaux et érythèmes noueux.
- Les manifestations oculaires (16,28%) sont des conjonctivites, kératites, uvéites antérieures, épisclérites et hypersensibilité à la lumière.
- Les manifestations cardio-vasculaires sous forme d'HTA type III sont retrouvées chez un seul patient (2,32%).
- Un seul patient présente la polykystose rénale (2,32%).

Résultats et discussion

Dans notre cohorte 20,93% des patients présentent simultanément 2 à 3 signes extra-digestifs, ceci rejoint les observations de Diego et al (2006).

Dans notre étude 79,07% des patients sont atteints de pathologies musculo-squelettiques, la littérature, rapporte une fluctuation allant de 10 à 70% des patients.

8. Classification phénotypique

Pour différencier les phénotypes de la MC, nous nous sommes basés sur les critères de Vienne, à savoir l'âge de diagnostic de la maladie, sa localisation et l'intensité de la maladie.

8.1. Age de début

La distribution selon l'âge est bimodale, bien que la maladie peut se déclencher à n'importe quel âge, elle est rarement diagnostiquée durant la petite enfance, et nous la trouvons plus fréquemment dans le groupe des adolescents et des jeunes adultes entre 20 et 30 ans, un autre pic se dessine chez les personnes plus âgées (50-70 ans). De plus une sous-estimation du nombre de malades pourrait exister en raison d'un risque de confusion de MC avec un syndrome du côlon irritable (Tableau 13).

Tableau 13 : Répartition des patients selon l'âge de début de la maladie

L'âge de début	Effectif (n)	Pourcentage (%)
<40 ans (A1)	80	77,7
≥40 ans (A2)	23	22,3

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

8.2. Localisation anatomique de la maladie

La MC est une inflammation persistante qui peut toucher toutes les parois du tube digestif, de l'œsophage à l'anus. Chez nos patients, la maladie est localisée le plus souvent au niveau de la partie iléo-colique (41,47%). L'iléon est atteint isolément dans 32,1% et le colon

Résultats et discussion

dans 23,3% des cas, par ailleurs, 2,9% des patients ont une localisation ano-périnéale spécifique associée.

Globalement ces pourcentages relatifs concordent avec les résultats des études réalisées dans d'autres régions de l'Algérie (Bounab, 2011 et Meddour *et al.*, 2014) avec une nette prédominance de la partie iléo-colique (L3). Une grande variabilité est rapportée dans d'autres études à travers le monde. Cependant, dans tous les cas de figure, le type L4 est très rare voire inexistant (Tableau 14).

Tableau 14 : Localisation de la maladie dans certain séries

Auteurs	Pays	Année	L1 (%)	L2 (%)	L3 (%)	L4 (%)
De Diego et al	Espagne	2006	38	21	37	4
Baptista et al	Brésil	2008	38,5	23,5	32,6	1,1
Gazouli et al	Grèce	2010	33,24	10,50	51,38	4,94
Bounab et al	Algérie	2011	29,6	19	51,4	0
Wei et al	Taiwan	2011	19,1	18,2	31,8	5,4
Azzam et al	Arabie Saoudite	2012	21,7	19,6	58,7	0
Elazzaoui	Maroc	2012	11,50	33,5	55	0
Kassem et al	Egypte	2014	32	11	57	0
Meddour et al	Algérie	2014	22	24	51	2
Serghini et al	Tunisie	2016	28	35	37	0
Daoui et al	Algérie	2016	32,1	23,3	41,47	2,9

8.2.1. En fonction de l'âge

La distribution de la localisation des lésions selon l'âge des patients, montre que la maladie touche la partie iléo-colique chez les jeunes patients, et la partie colique chez les patients âgés. La localisation des lésions en amont du tiers distal de l'iléon (L4) est absente dans la tranche d'âge 30 à 59 ans, et présente de manière égale dans les tranches d'âge 10 à 29 ans et 60 à 69 ans (Figure 11).

Polito et al (1996) et Elazzaoui (2012), ont trouvé la même distribution que nous pour la localisation de la maladie en fonction de l'âge des patients.

Résultats et discussion

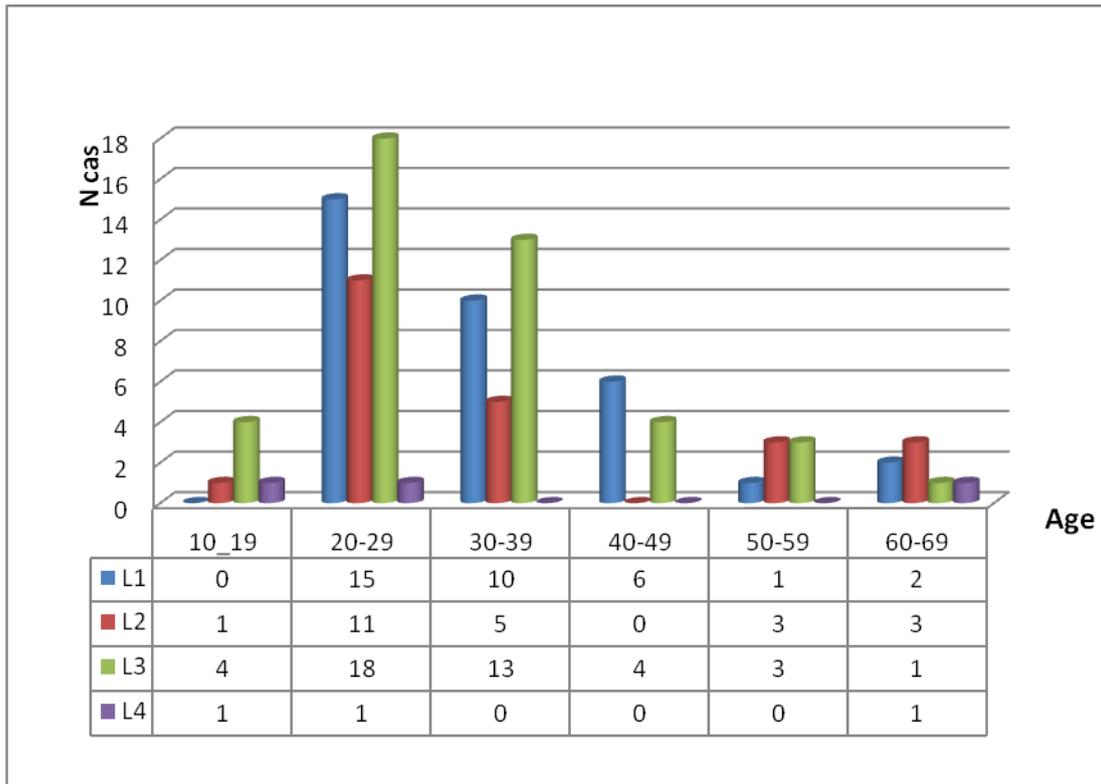


Figure 11 : Répartition des localisations selon l'âge des patients

8.2.2. En fonction du sexe

La distribution de la localisation des lésions selon le sexe est représentée dans la figure ci-dessous.

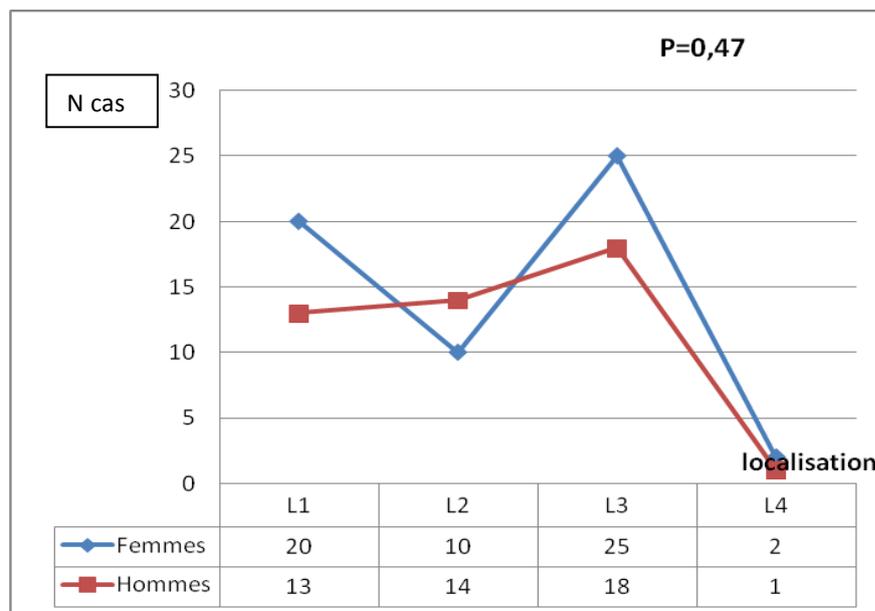


Figure 12 : Répartition des localisations selon le sexe

Résultats et discussion

Selon la figure :

- la localisation iléal (L1) est plus fréquente chez les femmes (60,60%) que chez les hommes (39,39%) ($p=0,47$).
- dans l'atteinte colique (L2), un pourcentage de 58,33% a été observé, donc plus important pour les hommes.
- la localisation iléo-colique (L3) est la plus fréquente chez les femmes que chez les hommes avec une fréquence de 58,14 % et de 41,86%, respectivement.
- la localisation des lésions en amont du tiers distal de l'iléon (L4) est deux fois plus chez les femmes par rapport aux hommes.

La prédominance féminine dans les atteintes iléales n'est pas spécifique à nos patients seulement, elle est observée dans la population Marocaine (Elazzaoui, 2012).

- **Les Lésions ano-périnéales (LAP)**, sont très caractéristiques de la MC et d'une grande valeur diagnostique. Elles sont d'autant plus fréquentes que la MC est distale et quasi constante en cas d'atteinte du rectum. On retrouve 25,24% de cas dans notre série. Alors que, leur incidence varie selon les études entre 10 à 80 %. Elles sont retrouvées dans 20 à 30 % des atteintes iléales, 50 à 60 % dans les MC coliques. Selon nos résultats les LAP sont associées beaucoup plus aux localisations iléo-coliques et coliques pures (80 %) et isolées dans 3,4 % des cas. Elles peuvent être présentes à n'importe quel stade de la maladie et dans un tiers des cas elles précèdent même les atteintes intestinales (Cosnes *et al.*, 2011).

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

8.3. Intensité de la maladie

La MC est classée selon les critères de sévérité et de type de lésions, cette classification est établie par le médecin qui se base sur les résultats cliniques, endoscopiques et histologiques.

Ainsi la forme sténosante est la plus fréquente (58,2%) chez nos patients, suivie de la forme non fistulisante, non sténosante (22,3%) et la forme fistulisante (19,5%). L'intensité de la maladie est variable en fonction de plusieurs paramètres qui sont concomitants avec la période des crises ou en dehors des poussés inflammatoires.

La prédominance de la forme sténosante est observée dans les études qui ont été réalisées dans la région centre-algérienne (Meddour *et al.*, 2014), en Allemagne (Glas *et al.*, 2008), et

Résultats et discussion

en Australie (Bhullar *et al.*, 2014). Alors que dans d'autres populations du monde, en particulier au Maroc et en Tunisie, pays voisins, la proportion de la forme B2 (sténosante) est relativement faible (Serghini *et al.*, 2016 ; Elazzaoui, 2012). (Tableau 15),

Une particularité a été observée dans notre étude, 6 patients ont présenté deux phénotypes à la fois, la forme sténosante avec la forme fistulisante, ce qui est très rare. Aucun cas pareil dans la littérature n'a été rapporté.

Tableau 15 : Distribution des différents phénotypes selon certaines séries

Auteurs	Pays	Année	B1	B2	B3
Buning <i>et al</i>	Allemagne	2004	21,9	68,8	45,3
De Diego <i>et al</i>	Espagne	2006	53	14	33
Baptista <i>et al</i>	Brésil	2008	28,9	20,3	50,8
Gazouli <i>et al</i>	Grèce	2010	61,26	27,20	11,54
Bounab <i>et al</i>	Algérie	2011	40,7	33,6	25,7
Wei <i>et al</i>	Taiwan	2011	41,8	33,6	24,6
Azzam <i>et al</i>	Arabie Saoudite	2012	34,8	15,2	47,8
Elazzaoui	Maroc	2012	53,8	12	34,2
Schnitzler <i>et al</i>	Allemagne	2014	25,5	25	49,5
Meddour <i>et al</i>	Algérie	2014	26	65	8
Bhullar <i>et al</i>	Australie	2014	20	60	20
Serghini <i>et al</i>	Tunisie	2016	37	27,40	23,40
Daoui <i>et al</i>	Algérie	2016	22,3	58,2	19,5

A travers notre enquête, il existe une corrélation entre le jeune âge de début de la maladie et la forme sténosante (B2), et une fréquence élevée principalement dans la tranche d'âge 20-29 ans. Au-delà de 29 ans, la forme sténosante est moins fréquente, cependant, elle reste prédominante par rapport aux deux autres formes (Figure 13).

Concernant la forme inflammatoire (non sténosante et non fistulisante), elle touche beaucoup plus les patients dans les tranches d'âge 20-29 et 30-39 ans, et sa fréquence est élevée dans la tranche d'âge 20-29 ans alors que la fréquence de la forme fistulisante est très élevée dans la tranche d'âge 30-39 ans.

Résultats et discussion

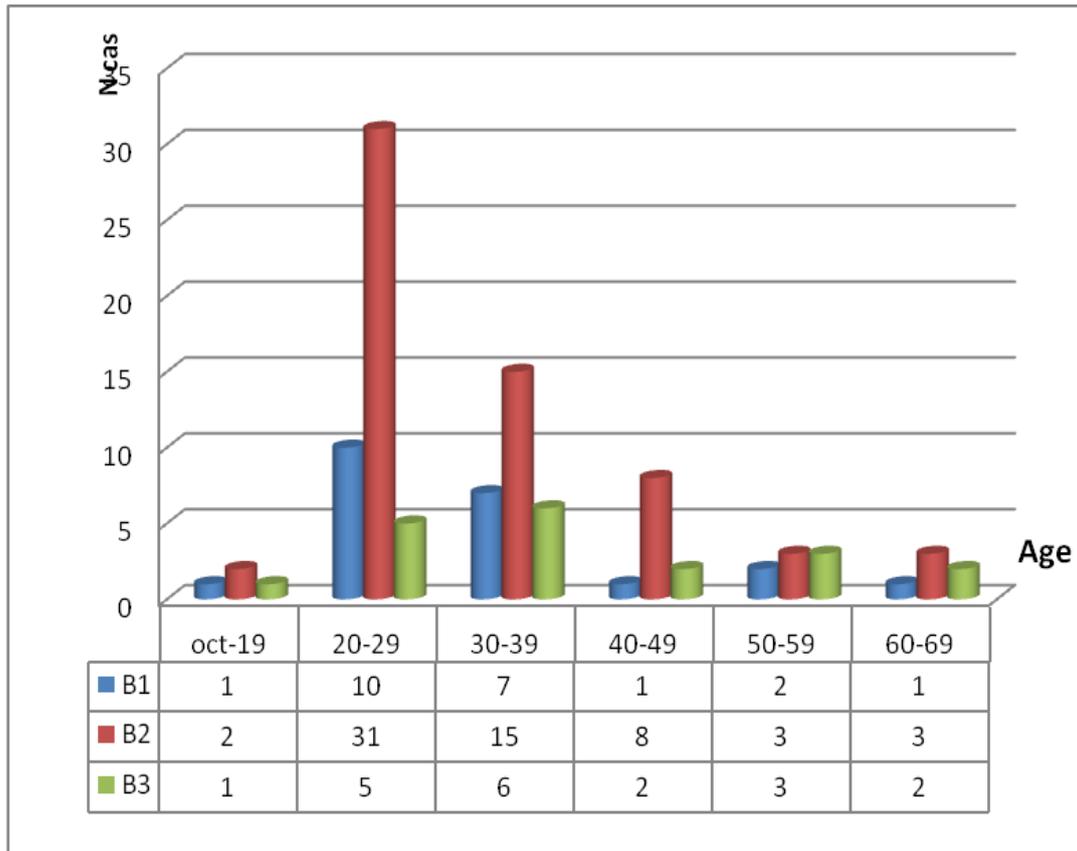


Figure 13 : Répartition de l'intensité de la maladie selon l'âge des patients

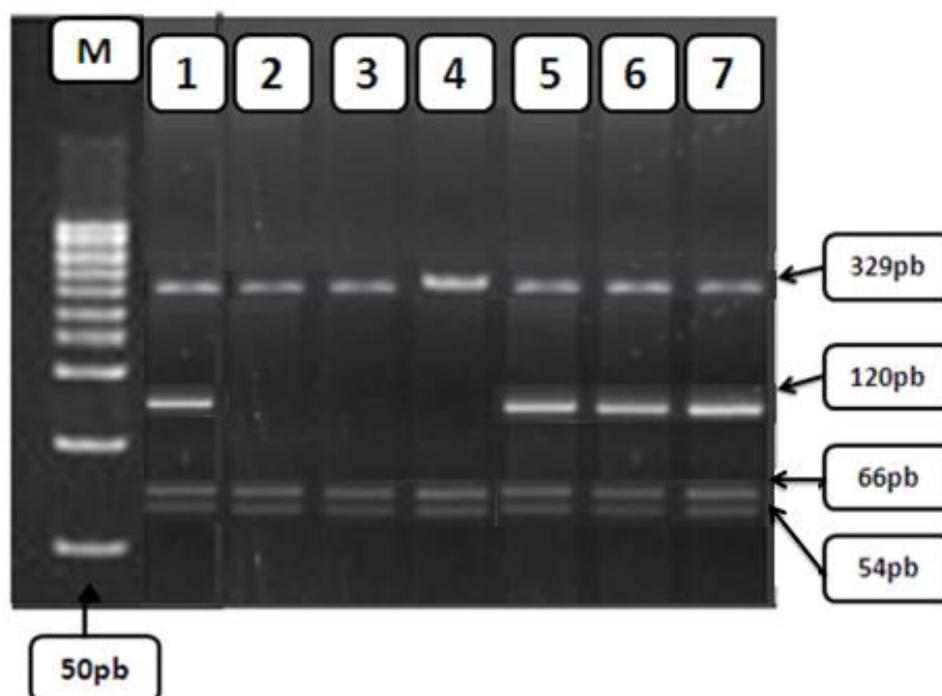
Certaines études ont montré que la localisation de la maladie reste globalement fixe dans le temps (moins de 15 % de changement de localisation sur 10 ans), dans près de 50 % des cas, le profil phénotypique se modifie, les changements les plus fréquents sont le passage d'une forme inflammatoire à une forme sténosante ou fibrosante ou à une forme pénétrante (29,4 % dans un délai de 6 ans). Ce changement phénotypique semble être un phénomène relativement stable au cours du temps, 25 à 33 % des formes inflammatoires devenant sténosantes ou perforatives tous les 5 ans (Louis *et al.*, 2001 ; Cosnes *et al.*, 2002).

II. Résultats de l'analyse moléculaire du gène *CARD15/NOD2*

1. Polymorphisme R702W

1.1. Fréquences alléliques et génotypiques

Après digestion de nos amplicons, les bandes observées sur les gels d'électrophorèse montrent uniquement la présence de deux génotypes différents : le génotype homozygote sauvage et le génotype hétérozygote, alors que le génotype homozygote muté « TT » est absent dans les deux populations malades et témoins (Photographie 4) :



Photographie 4 : Profil de digestion du polymorphisme R702W

- L'homozygote sauvage « CC » est caractérisé par la présence de trois bandes de 329, 66 et 54 pb (sujets : 2, 3 et 4).
- L'hétérozygote « CT » est précisé par la présence de quatre bandes de 329, 66, 54 et 120 pb (sujets : 1, 5, 6 et 7).

Le génotype homozygote sauvage « CC » est retrouvé dans 95,14% des patients et 99,30% chez les témoins, alors que le génotype hétérozygote « CT » est retrouvé chez 4,85% des patients et 0,7% des témoins (Tableau 16).

Résultats et discussion

Tableau 16 : Représentation des effectifs génotypiques du polymorphisme R702W chez la population témoin et patient

R702W	Génotypes	
	Patients	Témoins
WT/WT (C/C)	98	143
WT/WM (C/T)	5	1
WM/WM (T/T)	0	0

Si l'on considère la fréquence allélique, l'allèle muté «T» est plus représenté chez les patients que chez les témoins (1,46% vs. 0,35%). La p-value est inférieure à 0,05. Statistiquement le polymorphisme R702W indique que l'allèle muté jouerait un rôle dans l'apparition de la MC (Tableau 17).

Tableau 17 : Fréquences de l'allèle muté chez les patients et les témoins

Polymorphisme	Fréquence de l'allèle muté		Le pourcentage (%)		Odds Ratio (95% CI)	p-value
	MC	Témoins	MC	Témoins		
R702W	1,46	0,35	4,85	0,7	7,30 (0,81-167,61)	0,036

L'étude du polymorphisme R702W réalisée en Arabie Saoudite indique qu'il y a une association significative avec la MC, similaire à nos résultats. De même qu'une étude sur une population de la région d'Alger rapporte une fréquence allélique de 5, associée avec la MC, alors que les études qui ont été réalisées au Maroc, en Tunisie et en Turquie ne trouvent pas cette association (Tableau 18).

Concernant les études qui ont été réalisées en Europe, en Asie, en Amérique et en Australie, l'association entre le polymorphisme R702W et la MC est hautement significative (Tableau 18).

Résultats et discussion

Tableau 18 : Comparaison des fréquences des allèles mineurs du polymorphisme R702W chez certaines populations

Auteurs	Année	Pays	Nombre de patients	Fréquence	Signification
Zouiten-mekki et al	2005	Tunisie	130	1,9	–
De Diego et al	2006	Espagne	183	28	+
Rigoli et al	2008	Italie	133	9,8	+
Derakhshan et al	2008	Iran	40	13	+
Baptista et al	2008	Brésil	187	9,36	+
Tekin et al	2009	Turquie	45	1,4	–
Gazouli et al	2010	Grèce	364	9,1	+
Azzam et al	2012	Arabie Saoudite	46	5,22	+
Hamma et al	2012	Maroc	101	0,49	–
Meddour et al	2014	Algérie	204	5	+
Bhullar et al	2014	Australie	30	16,7	+
Daoui et al	2016	Algérie	103	1,46	+

1.2. Corrélation du R702W et l'âge de début de la maladie

Comme dans beaucoup d'études portant sur la corrélation de la pathologie avec l'âge de l'apparition de la maladie, aucune relation n'est remarquée que ce soit en rapport avec le groupe A1 ou le groupe A2 dans notre étude (Tableau 19). Le même résultat est observé dans la population saoudienne et brésilienne (Baptista *et al.*, 2008 ; Azzam *et al.*, 2012).

Résultats et discussion

Tableau 19 : Corrélation du polymorphisme R702W et l'âge de début de la maladie

Age	Effectif (n)			Pourcentage (%)			OR	p-value
	CT	CC	TT	CT	CC	TT		
A1: < 40 ans	3/80	77/80	0	3,75	96,25	0	0,41	0,33
A2: > 40 ans	2/23	21/23	0	8,62	91,30	0		

A l'inverse de notre résultat, Meddour et al (2014) qui ont travaillé sur une population algéroise, montrent qu'il y a une corrélation significative entre l'apparition de la maladie à un âge précoce et la présence de l'allèle muté « T » du polymorphisme R702W. Cette association est observée également dans les études qui ont été réalisées sur la population française, espagnole, les juifs ashkénazes et grecques (Zhou *et al.*, 2002; Economou *et al.*, 2004; De Diego *et al.*, 2006 ; Lesage *et al.*, 2012).

1.3. Corrélation du R702W et localisation de la MC

Parmi les cinq patients hétérozygotes « CT », quatre patients possèdent des lésions dans la partie Iléo-colique (L3), mais statistiquement il n'y a pas une association significative entre le polymorphisme R702W et l'apparition de la MC dans cette région du tube digestif (Tableau 20). La maladie est localisée dans la partie du colon chez un seul patient qui porte l'allèle muté « T », sans lien avec la localisation des lésions.

Dans les deux autres classes, L1 et L4, aucun patient « CT » n'a été trouvé.

Tableau 20 : Corrélation du polymorphisme R702W et la localisation de la MC

Localisation de MC	Effectif (n)			Pourcentage (%)			OR	p-value
	CT	CC	TT	CT	CC	TT		
L1	0/33	33/33	0	0,00	100	0	0,00	0,00
L2	1/24	23/24	0	4,16	95,83	0	0,85	0,85
L3	4/43	39/43	0	9,30	90,69	0	6,05	0,07
L4	0/3	3/3	0	0,00	100	0	0,00	0,00

Résultats et discussion

Cette absence de corrélation est notée dans la plupart des travaux publiés sur la corrélation génotype-phénotype de la MC (De Diego *et al.*, 2006 ; Baptista *et al.*, 2008 ; Al-Sulaiman *et al.*, 2014 et Meddour *et al.*, 2014).

Par ailleurs, Jung et al (2012) ont rapporté une corrélation positive et significative entre la présence de l'allèle muté « T » et la localisation iléale des lésions (L1). Cette étude a été réalisée sur une population française de 798 patients et basée sur la corrélation génotype-phénotype avec l'intérêt clinique de faire un génotype pour les 53 polymorphismes associés à la MC.

1.4. Corrélation du polymorphisme R702W et intensité de la maladie

La classification de la MC selon la forme des lésions, montre que la forme sténosante (B2) est prédominante sur les autres formes, mais ne donne pas une corrélation significative entre la présence de l'allèle muté « T » et l'intensité de la maladie (Tableau 21), résultats retrouvés dans d'autres études (Rigoli *et al.*, 2008 ; Baptista *et al.*, 2008 ; Tekin *et al.*, 2009 ; Azzam *et al.*, 2012 ; Meddour *et al.*, 2014). Par contre, d'autres auteurs ont observé une corrélation significative entre l'allèle muté « T » et la forme sténosante des lésions (B2) (Lésage *et al.*, 2001 ; De Diego *et al.*, 2006).

Tableau 21 : Corrélation du polymorphisme R702W et l'intensité de la maladie

L'intensité de la MC	Effectif (n)			Pourcentage (%)			OR	p-value
	CT	CC	TT	CT	CC	TT		
B1	1/23	22/23	0	4,35	95,65	0	0,89	0,89
B2	4/60	56/60	0	6,66	93,33	0	3,00	0,31
B3	0/20	20/20	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00

1.5. Corrélation du R702W et signes extra-digestifs

Les signes extra-digestifs se retrouvent chez 41,7% des patients, 17,31% de ces patients portent l'allèle muté « T ». Après les calculs statistiques de chaque signe extra-digestif ou l'ensemble des signes extra-digestifs, nous n'avons trouvé aucune corrélation significative entre le polymorphisme R702W et la présence des signes extra-digestifs (Tableau 22).

Résultats et discussion

Tableau 22 : Corrélation du polymorphisme R702W et les signes extra-digestifs

Signes extra-digestifs	Effectifs (n)			Pourcentage (%)			OR	p-value
	CT	CC	TT	CT	CC	TT		
Articulaires	1/33	32/33	0	3,03	96,96	0	0,22	0,26
Oculaires	1/7	6/7	0	14,28	85,71	0	5,50	0,20
Rénaux	0/1	1/1	0	0	100	0	0	0,00
Total	2/43	41/43	0	4,65	95,34	0	0,93	0,93

Selon Buning et al (2004), la présence de l'allèle muté « T » ne présente aucune corrélation significative avec l'apparition des signes extra-digestifs chez les patients allemands atteint de la MC.

Les mêmes résultats sont observés dans la population Turque, du centre algérien et la population saoudienne (Tekin *et al.*, 2009 ; Al-Sulaiman *et al.*, 2014 ; Meddour *et al.*, 2014).

Si l'on résume les données concernant l'association génotype (Polymorphisme R702W)/phénotype et les aspects cliniques de la MC : localisation des lésions, intensité, âge, aucune corrélation n'est observée.

2. Polymorphisme G908R

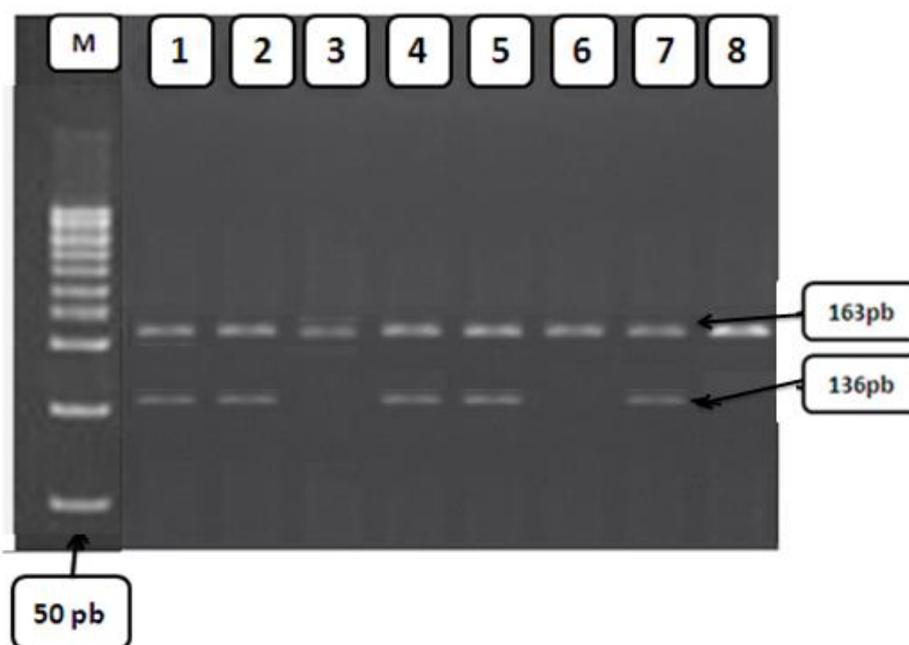
2.1. Fréquences alléliques et génotypiques

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

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

PS : La bande de 27 pb pour les différents génotypes n'est pas visible sur le gel d'agarose à cause de sa petite taille (photographie 5).

Résultats et discussion



Photographie 5 : Profil de digestion du produit de PCR du polymorphisme G908R
(GC :sujets 1, 2, 4, 5, et 7 ; GG : sujets 3, 6 et 8)

Dans notre série, les profils électrophorétiques ne montrent que deux génotypes, l'homozygote normal « GG » (88,34% chez les patients et 93,05% chez les témoins) et l'hétérozygote « GC » (11,65% des patients et 6,94% des témoins), alors que le génotype homozygote muté « CC » est absent dans les deux populations malade et témoin (Tableau 23).

Tableau 23 : Représentation des effectifs génotypiques du polymorphisme G908R chez la population témoin et malade

G908R	Génotypes	
	MC	Contrôles
WT/WT (G/G)	91	134
WT/WM (G/C)	12	10
WM/WM (C/C)	0	0

La fréquence de l'allèle muté est plus importante chez les patients (5,83%) que chez les témoins (3,5%), statistiquement, il n'y a pas une association significative entre le polymorphisme G908R et la MC (Tableau 24).

Résultats et discussion

Tableau 24 : Fréquences de l'allèle muté chez les patients et les témoins

Polymorphisme	Fréquence de l'allèle muté		Le pourcentage (%)		Odds Ratio (95% CI)	p-value
	MC	Témoins	MC	Témoins		
G908R	5,83	3,5	11,75	6,94	1,77 (0,68-4,64)	0,20

Une concordance avec nos résultats est retrouvée dans la plupart des études qui ont été réalisées en Tunisie, au Maroc, en Turquie et en Espagne (Tableau 25). Par contre une autre étude Algéroise a révélé une association significative entre le polymorphisme G908R et la MC (Meddour *et al.*, 2014). Les mêmes résultats sont notées en Arabie Saoudite et en Grèce (Gazouli *et al.*, 2010 ; Azzam *et al.*, 2012).

Tableau 25 : Comparaison des fréquences des allèles mineurs du G908R chez certaines populations

Auteurs	Année	Pays	Nombre de patients	Fréquence	Signification
Zouiten-mekki et al	2005	Tunisie	130	5	-
De Diego et al	2006	Espagne	183	3	-
Rigoli et al	2008	Italie	133	4,5	-
Derakhshan et al	2008	Iran	40	4	-
Baptista et al	2008	Brésil	187	1,93	-
Tekin et al	2009	Turquie	45	3,3	-
Gazouli et al	2010	Grèce	364	10	+
Hamma et al	2012	Maroc	101	6,43	-
Azzam et al	2012	Arabie Saoudite	46	4,22	+
Meddour et al	2014	Algérie	204	3	+
Bhullar et al	2014	Australie	30	3	-
Daoui et al	2016	Algérie	103	5,85	-

Résultats et discussion

2.2. Corrélation du G908R et l'âge de début de la MC

Lorsque nous considérons le début de survenue de la maladie et le polymorphisme G908R, il n'y a aucun lien en particulier entre l'allèle muté « C » et l'âge d'apparition de la maladie (Tableau 26).

Tableau 26 : Corrélation de l'âge de début et le polymorphisme G908R

Age	Effectif (n)			Pourcentage (%)			OR	p-value
	GC	GG	CC	GC	GG	CC		
A1: < 40 ans	10/80	70/80	0	12,5	87,5	0	1,50	0,61
A2: > 40 ans	2/23	21/23	0	8,7	91,30	0		

Les résultats de Uyar *et al.*, 2006 ; Rigoli *et al.*, 2008 ; Meddour *et al.*, 2014, ont montré une absence de corrélation concernant ce polymorphisme et l'âge de début de la maladie.

2.3. Corrélation du G908R et localisation de la MC

La partie iléo-colique est la plus touchée chez les patients qui portent cette mutation (14%). D'après les résultats obtenus, nous pouvons dire que la localisation de la maladie n'est pas influencée par la présence de l'allèle muté (Tableau 27).

Tableau 27 : Corrélation de la localisation de la MC et le polymorphisme G908R

Localisation de MC	Effectif (n)			Pourcentage (%)			OR	p-value
	GC	GG	CC	GC	GG	CC		
L1	3/33	30/33	0	9	90,90	0	0,76	0,68
L2	3/24	21/24	0	12,5	87,5	0	1,11	0,88
L3	6/43	37/43	0	14	86,04	0	1,46	0,53
L4	0/3	3/3	0	0	100	0	0	0,00

Cette conclusion est également observée dans des études qui ont été réalisées sur la population finlandaise, américaine, bosnienne et française (Helio *et al.*, 2002 ; Jung *et al.*, 2012 ; Naser *et al.*, 2012 ; Salkic *et al.*, 2015).

Résultats et discussion

2.4. Corrélation du G908R et intensité de la MC

Dans notre série, la forme sténosante a été observée chez 7 patients hétérozygotes (GC), 3 patients avec une forme fistulisante, et 2 possèdent le type inflammatoire. D'après la p-value qui a été calculée dans les trois formes, nous avons conclu qu'il n'y a pas une association significative entre la présence de la mutation G908R et l'intensité ou le type de la maladie (Tableau 28).

Tableau 28 : Corrélation du polymorphisme G908R et l'intensité de la MC

Intensité de la MC	Effectif (n)			Pourcentage (%)			OR	p-value
	GC	GG	CC	GC	GG	CC		
B1	2/23	21/23	0	8,7	91,30	0	0,67	0,61
B2	7/60	53/60	0	11,66	88,33	0	1,00	0,99
B3	3/20	17/20	0	15	85	0	1,25	0,60

L'absence de l'association entre l'allèle muté et l'intensité de la maladie observée dans notre échantillon d'étude, a été également signalée en Arabie Saoudite, au Brésil, en France, en Hongrie et en Turquie (Baptista *et al.*, 2008; Tekin *et al.*, 2009 ; Csongei *et al.*, 2010 ; Azzam *et al.*, 2012 ; Jung *et al.*, 2012).

Selon Rigoli et al (2008), la présence de l'allèle muté « C » est associée avec la forme sténosante chez la population italienne. Cette corrélation est rapportée par d'autres études similaires (Cuthbert *et al.*, 2002 ; Annese *et al.*, 2005).

2.5. Corrélation du G908R et signes extra-digestifs

Les signes extra-digestifs sont observés chez 4 patients, mais aucune association significative n'a été détectée que pour le patient qui présente une polykystose rénale, mais ce résultat ne peut être pris en considération vu l'effectif de notre cohorte (Tableau 29).

Résultats et discussion

Tableau 29 : Corrélation du polymorphisme G908R et les signes extra-digestifs

Signes extra-digestifs	Effectifs (n)			Pourcentage (%)			OR e	p- valu
	GC	GG	CC	GC	GG	CC		
Articulaires	3/33	30/33	0	9,09	90,90	0	0,70	0,77
Oculaires	0/7	7/7	0	0	100	0	0	0,00
Rénaux	1/1	0/1	0	100	0	0	/	0,002
Total	4/43	39/43	0	9,30	90,69	0	0,67	0,52

Dans la littérature, l'apparition des signes extra-digestifs n'est pas associée avec l'allèle muté « C » (Rigoli *et al.* 2008 ; Azzam *et al.*, 2012 ; Hovde et Mou, 2012 ; Jung *et al.*, 2012 ; Meddour *et al.*, 2014).

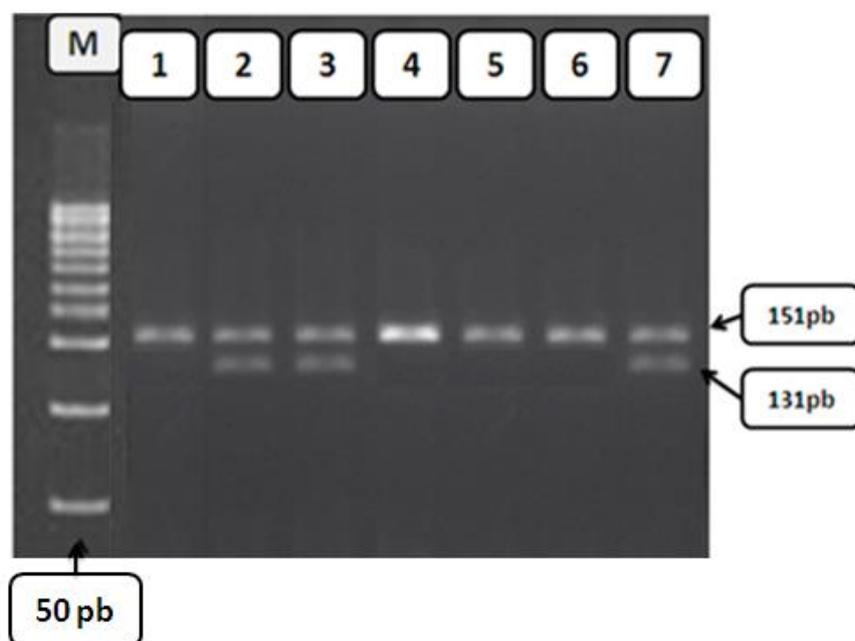
3. Polymorphisme 1007fs

3.1. Fréquences alléliques et génotypiques

Les profils électrophorétiques ont donné un ensemble de bandes correspondant aux fragments qui résultent de la digestion enzymatique. Deux génotypes différents ont été distingués selon la taille de ces fragments : l'homozygote sauvage (WT/WT) avec l'apparition d'une seule bande de 151 pb et l'hétérozygote (WT/WM), révélé par deux bandes de tailles différentes, 151 et 131 pb.

Comme pour les deux polymorphismes R702W et G908R, le génotype homozygote muté est absent dans les deux populations malades et témoins. Un exemple de profil électrophorétique est présenté dans la photographie 6.

Résultats et discussion



Photographie 6 : Profil de digestion des amplicons du polymorphisme 1007fs

Selon la figure ci dessus, les patients 1, 4, 5 et 6 ont un génotype homozygote sauvage et les patients 2, 3 et 7 ont un génotype hétérozygote.

Dans notre cohorte, le génotype homozygote sauvage est présent chez 90,29% des patients et 97,91% chez les témoins, alors que le génotype hétérozygote est retrouvé chez 9,71% des patients et 2,08% des témoins (Tableau 30).

Tableau 30 : Représentation des effectifs génotypiques du polymorphisme 1007fs chez les populations témoin et malade

1007fs	Génotypes	
	MC	Témoins
WT/WT	93	141
WT/WM	10	3
WM/WM	0	0

En parallèle la fréquence allélique est plus importante chez les patients que les témoins, statistiquement la p-value est inférieure à 0,05, donc il y a une association significative entre le polymorphisme 1007fs et la MC (Tableau 31).

Résultats et discussion

Tableau 31 : Fréquences de l'allèle muté chez les patients et les témoins

Polymorphisme	Fréquence de l'allèle muté		Le pourcentage (%)		Odds Ratio (95% CI)	p-value
	MC	Témoins	MC	Témoins		
1007fs	4,85	1,04	9,71	2,08	5,05 (1,24-23,83)	0,008

Dans l'Est Algérien, notre étude est la première qui analyse la liaison génétique entre le polymorphisme 1007fs et la MC.

Notre résultat est identique avec les études qui ont été effectuées en Grèce, en Italie et en Australie. Parmi les pays arabes, seule l'étude réalisée en Arabie Saoudite trouve également une liaison entre le polymorphisme 1007fs et la MC.

contrairement à nos résultats les études menées en Tunisie et au Maroc qui sont deux pays très proches géographiquement de notre population, ont rapporté qu'il n'y a pas d'association positive entre ce polymorphisme et la MC (Zouiten-mekki *et al.*, 2005 ; Hamma *et al.*, 2012) (Tableau 32).

Tableau 32 : Comparaison des fréquences des allèles mineurs du 1007fs chez certaines populations

Auteurs	Année	Pays	Nombre de patients	Fréquence	Signification
Zouiten-mekki et al	2005	Tunisie	130	1	-
De Diego et al	2006	Espagne	183	4,6	-
Rigoli et al	2008	Italie	133	9,8	+
Derakhshan et al	2008	Iran	40	2	-
Baptista et al	2008	Brésil	187	3,48	-
Tekin et al	2009	Turquie	45	4,4	-
Gazouli et al	2010	Grèce	364	9,47	+
Hamma et al	2012	Maroc	101	0,99	-
Azzam et al	2012	Arabie Saoudite	46	4,56	+
Bhullar et al	2014	Australie	30	13,3	+
Daoui et al	2016	Algérie	103	4,85	+

Résultats et discussion

3.2. Corrélation du 1007fs et l'âge de début de la MC

Dans notre étude, la présence de l'allèle muté du polymorphisme 1007fs est associée avec l'âge des patients. Selon les calculs statistiques, nous avons conclu que cette association concerne la classe A1 ($p=0,02$). La corrélation du polymorphisme 1007fs et l'âge de début de la MC est observée dans l'étude de Schnitzler et al (2014), qui ont trouvé que les patients qui portent les deux allèles mutés du polymorphisme 1007fs sont des sujets classés en A1.

3.3. Corrélation du 1007fs et localisation de la maladie

La répartition des patients qui portent la mutation 1007fs selon la localisation des lésions dans le tube digestif, montre que la maladie touche le colon chez 2 patients, la partie iléo-colique chez 7 patients, et une seule patiente possède des lésions dans le tiers distal de l'iléon.

Les calculs statistiques dans les trois classes montrent qu'il n'y a pas d'association significative entre la présence du polymorphisme 1007fs et la localisation de la MC. (Tableau 33).

Tableau 33 : Corrélation du polymorphisme 1007fs et la localisation de la MC

Localisation de MC	Effectif (n)			Pourcentage (%)			OR	p-value
	WT/W	WT/WT	WM/WM	WT/WM	WT/WT	WM/WM		
L1	0/33	33/33	0	0	100	0	0	0,00
L2	2/24	22/24	0	8,33	91,66	0	0,81	0,79
L3	7/43	36/43	0	16,27	83,72	0	3,69	0,05
L4	1/3	2/3	0	33,33	66,66	0	3,78	0,26

Les études publiées récemment ont montré les mêmes résultats que notre étude (Baptista *et al.*, 2008 ; Azzam *et al.*, 2012 ; Buhllar *et al.*, 2014).

Dans la littérature, Jung et al (2012) ont rapporté une corrélation significative entre le polymorphisme 1007fs et la localisation iléale des lésions chez les patients d'origine française

Résultats et discussion

atteints de la MC. Le même résultat a été pareillement observé pour les études de De Diego et al (2006) et Rigoli et al (2008).

3.4. Corrélation du 1007fs et intensité de la maladie

Parmi les 10 patients qui portent l'allèle muté du polymorphisme 1007fs, nous avons 9 qui possèdent une forme sténosante (B2). Statistiquement cette prédominance de la forme sténose montre une association significative entre le polymorphisme 1007fs et l'intensité de la maladie (Tableau 34).

Tableau 34 : Corrélation du polymorphisme 1007fs et l'intensité de la maladie

Intensité de la MC	Effectif (n)			Pourcentage (%)			OR	p-value
	WT/WM	WT/WT	WM/WM	WT/WM	WT/WT	WM/WM		
B1	1/23	22/23	0	4,35	95,65	0	0,36	0,32
B2	9/60	51/60	0	15	85	0	7,41	0,03
B3	0/20	20/20	0	0	100	0	0	0,00

En 2005, Kugathasan et al ont publié une étude de corrélation entre le génotype du gène *CARD15/NOD2* et le phénotype de la MC chez des enfants afro-américains, des américains d'origine hispanique et les américains blancs. Cette étude a révélé une association positive entre la présence de l'allèle muté du polymorphisme 1007fs et la forme sténosante, cette association est plus significative chez les enfants américains blancs. La même association a été confirmée dans les études de De Diego et al (2006) ; Jung et al (2012) et Schnitzler et al (2014).

3.5. Corrélation du 1007fs et signes extra-digestifs

Les signes extra-digestifs sont observés chez un seul patient qui porte cette mutation, dans ce cas, la p-value est inférieure à 0,05, nous pouvons conclure qu'il existe une association significative entre le polymorphisme 1007fs et la présence des signes extra-digestifs (Articulaires) (Tableau 35).

Résultats et discussion

Tableau 35. Corrélation du polymorphisme 1007fs et les signes extra-digestifs

Signes extra-digestifs	Effectifs (n)			Pourcentage (%)			OR	p-value
	WT/WM	WT/WT	WM/WM	WT/WM	WT/WT	WM/WM		
Articulaires	1/33	32/33	0	3,03	96,96	0	1,25	0,61
Oculaires	0/7	7/7	0	0	100	0	0	0,00
Rénaux	0/1	1/1	0	0	100	0	0	0,00
Total	1/43	42/43	0	2,32	97,67	0	0,13	0,032

Selon Schnitzler et al (2014) et Rigoli et al (2008), le polymorphisme 1007fs est lié à l'apparition des signes extra-digestifs qui jouent un rôle important dans la sévérité de la MC.

4. Susceptibilité de la présence d'un seul allèle muté et phénotypes associés

Nous avons étudié le risque de la présence d'un seul allèle muté du gène *CARD15/NOD2*, parmi les trois polymorphismes R702W, G908R et 1007fs, et les caractéristiques cliniques ou (phénotype) des patients atteints de la MC.

Parmi les 103 patients atteints de la MC, nous avons 27 sujets qui possèdent au moins un seul allèle muté soit 26,21% des patients contre 9,72% chez les témoins.

4.1. Corrélation avec l'âge de début de la MC

Nous avons réalisé le même principe pour savoir si la présence d'une seule mutation du gène *CARD15/NOD2* est associée avec l'âge de l'apparition des premiers symptômes de la MC.

Selon le tableau 36, nous pouvons conclure qu'il n'y a pas une corrélation significative entre la mutation du gène *CARD15/NOD2* et l'âge de début de la maladie.

Résultats et discussion

Tableau 36 : Corrélation de la présence d'un allèle muté et l'âge de début de la MC

Age	Effectif (n)	Pourcentage (%)	OR	p-value
A1: < 40 ans	17/80	21,25	0,35	0,032
A2> 40 ans	10/23	34,48		

De Diego et al (2006), ont rapporté 4% des patients ayant deux allèles mutés du gène *CARD15/NOD2*, une association significative avec l'apparition de la MC à un âge précoce a été notée (<40 ans) ($p=0,042$).

4.2. Corrélation du génotype avec la localisation de la MC

L'étude de corrélation génotype-phénotype, montre une association significative entre la présence d'un seul allèle muté du gène *CARD15/NOD2* et la localisation des lésions au niveau du tube digestif. Le tableau 37 montre que la mutation du gène *CARD15/NOD2* est corrélée à une localisation iléale et iléo-colique dans la MC.

Tableau 37 : Corrélation de la présence d'un allèle muté et la localisation de la MC

Localisation de la MC	Effectif (n)	Pourcentage (%)	OR	p-value
L1	3/33	9,09	0,19	0,006
L2	5/24	20,83	0,68	0,49
L3	18/43	41,86	4,08	0,002
L4	1/3	33,33	1,42	0,77

De Diego et al (2006) ont trouvé une association significative entre le risque de la présence d'au moins un seul allèle muté du gène *CARD15/NOD2* et la forme iléale (L1) avec une $p=0,011$. Ces patients ont besoin de la chirurgie, ce qui a été également observé par Bonen et al (2003) ; Alvarez-Lobos et al (2005) et Rigoli et al (2008).

Alors que, Helio et al (2003) ont trouvé chez les patients atteints de la MC portant au moins une des trois variantes de *CARD15/NOD2*, l'iléon a été plus souvent touché que dans les patients non porteurs de la mutation (90% vs 73%, $p < 0,05$). Les mêmes conclusions ont été également publiées par Vermeire et al en 2002 sur la population canadienne.

Cependant, d'autres études n'ont pas trouvé de corrélation significative (Baptista *et al.*, 2008 ; Tekin *et al.*, 2009 ; Azzam *et al.*, 2012).

Résultats et discussion

4.3. Corrélation du génotype avec l'intensité de la MC

L'étude de la corrélation génotype-expression phénotypique présentée dans le questionnaire de chaque malade, a démontré que la mutation *CARD15/NOD2* n'est pas associée avec l'intensité de la maladie (Tableau 38).

Tableau 38. Corrélation de la présence d'un allèle et l'intensité de la maladie

Intensité de la maladie	Effectif (n)	(%)	OR	p-value
B1	4/23	17,4	0,52	0,27
B2	20/60	33,33	2,57	0,05
B3	3/20	15	0,43	0,20

Dans la littérature, plusieurs études ont signalé une association entre la forme sténosante ou la forme fistulisante avec la présence d'un seul allèle muté du gène *CARD15/NOD2*.

L'étude de Helio et al (2003) a montré une forte corrélation significative entre les deux formes sténosante et fistulisante et les patients qui portent une seule mutation par rapport aux patients non porteurs (88% vs 56%, $p < 0,01$), ces patients avaient un besoin accru de chirurgie intestinale.

D'autres études trouvent une corrélation avec la forme sténosante seulement (Abreu *et al.*, 2002 ; De Diego *et al.*, 2006).

De plus, Hampe et al (2002) ont trouvé une association entre la présence d'au moins un allèle muté du gène *CARD15/NOD2* et la forme fistulisante.

4.4. Corrélation du génotype avec les signes extra-digestifs

Nous avons étudié la corrélation entre la présence d'un allèle muté du gène *CARD15/NOD2* et l'apparition des signes extra-digestifs chez les patients atteints de la MC. Au même temps, nous avons prospecté la distribution des patients selon le type des signes extra-digestifs.

Selon le tableau 39, nous avons observé une association significative entre la mutation du gène *CARD15/NOD2* et l'apparition d'une maladie rénale chez un patient atteint de la MC.

Nos résultats ne concordent pas avec ceux des études qui ont été réalisées sur la population saoudienne, turque et brésilienne qui n'ont pas trouvé de corrélation (Baptista *et al.*, 2008 ; Tekin *et al.*, 2009 Azzam *et al.*, 2012).

Résultats et discussion

En considérant la liaison entre les signes extra-digestifs et la présence d'une mutation, nous n'avons observé ces signes que chez 43 patients : 33 avec des signes articulaires, 7 oculaires et 1 patient avec une polykystose rénale. En comparant les données obtenues, en ce qui concerne le polymorphisme G908R qui n'est pas associé avec la MC, et l'association de l'allèle muté du même polymorphisme avec la polykystose rénale, nous pouvons dire que la MC et les manifestations extra-digestifs sont probablement causées par des facteurs multiples et polygéniques.

Tableau 39 : Corrélation de la présence d'un allèle muté et les différents signes extra-digestifs

Signes extra-digestifs	Effectif (n)	Pourcentage (%)	OR	p-value
Articulaires	5/33	15,15	0,54	0,50
Oculaire	1/7	14,28	0,78	0,82
Rénaux	1/1	100	/	0,025
Total	7/43	16,28	0,58	0,28

5. Cas particulier : patient portant les trois allèles mutés

La présence de génotypes composites avec deux mutations différentes est un événement relativement rare qui n'a pas été trouvé dans notre population d'étude, alors que l'un des patients portent les trois mutations en même temps ce qui nous amené à nous intéresser à son cas.

Les données générales et cliniques de ce patient sont représentées dans le tableau 40.

Selon les caractéristiques cliniques, la maladie est sévère chez ce patient ayant le génotype hétérozygote pour les trois mutations.

Résultats et discussion

Tableau 40 : Caractéristiques cliniques du patient (cas particulier)

Caractéristiques cliniques	Patient (cas particulier)
Sexe	Masculin
Age	27 ans
Origine	Batna
Tabagisme	Oui
Consanguinité	Non
Antécédents familiaux	Non
Age de début	A1
Localisation de la maladie	L3
Intensité de la maladie	B2
Signes extra-digestifs	Oui (articulaires)

Le degré de sévérité de la maladie et l'âge de début ainsi que sa localisation sont fortement exacerbés chez ce patient.

Selon, Hugot (2002) la présence d'une mutation sur les deux gènes portés par les deux chromosomes entraîne un effet-dose, le risque relatif d'être malade est estimé à environ 20-40 fois supérieures à celui de la population générale pour les sujets doublement mutés.

Ce calcul du risque est important mais il est difficile de l'utiliser dans le cadre d'un conseil génétique s'adressant au malade ou à sa descendance, car le risque dépend de facteurs environnementaux.

6. Facteurs environnementaux

Sur un terrain génétiquement prédisposé, certains facteurs d'environnement sont capables de déclencher ou d'entretenir une MC. L'importance de ces facteurs est suggérée par le fait que le patrimoine génétique d'un groupe reste relativement constant dans le temps, alors qu'il est constaté une augmentation de l'incidence de la pathologie, ceci suggère l'influence des facteurs environnementaux, ainsi l'augmentation de la prévalence de la MC au cours des 50 dernières années a été rapportée par de nombreux auteurs, de même que dans certaines populations migrantes l'incidence de la MC a doublé en 10 ans (Louis *et al*, 2012) Dans notre étude, nous avons abordé l'influence des facteurs environnementaux, principalement le tabac, les facteurs alimentaires et psychologiques.

6.1. Tabac

Nous avons analysé l'association entre le gène *CARD15/NOD2* et le tabagisme chez tous les patients et pour chacune des mutations étudiées (Tableau 41).

- Polymorphisme R702W :

Parmi les 42 patients fumeurs, l'allèle muté «T» ne se retrouve que chez deux patients. Le tabac n'est pas un facteur de risque qui influence l'apparition de la MC. De Diego et al (2006), Tekin et al (2009), Al-Sulaiman et al (2014) et Meddour et al (2014) font mention du même constat.

- Polymorphisme G908R :

Bien qu'un seul patient fumeur porte l'allèle «C», Le calcul statistique montre une association significative entre le tabac et l'expression de cette mutation, mais cette conclusion ne peut être prise en considération, il peut s'agir d'un biais dû à la stratification de notre échantillon. Dans la population d'Alger, la population saoudienne, et la population française, aucune association significative entre l'allèle muté «C» et le tabac comme un facteur de risque pour la MC n'est rapportée (Azzam *et al.*, 2012 ; Jung *et al.*, 2012; Meddour *et al.*, 2014).

- Polymorphisme 1007fs :

Parmi les 10 patients qui portent cette mutation, nous avons un seul fumeur. Donc nous ne pouvons pas conclure qu'il y a une association à cause du nombre limité des patients fumeurs qui porte cette mutation malgré le calcul statistique.

De Diego et al (2006) montre une corrélation positive entre l'allèle muté du polymorphisme 1007fs et le tabac.

Résultats et discussion

Tableau 41 : Corrélation mutation-tabac

Mutation	Tabac	Effectif (n)			Pourcentage (%)			OR e	P- valu
		CT	CC	TT	CT	CC	TT		
R702W	Oui	2/42	40/42	0	4,76	95,23	0	0,97	0,97
	Non	4/61	57/61	0	6,65	93,44	0		
G908R		GC	GG	CC	GC	GG	CC	0,11	0,014
	Oui	1/42	41/42	0	2,38	97,61	0		
	Non	11/61	50/61	0	18,03	81,96	0		
1007fs		WT/ WM	WT/ WT	WM/ WM	WT/ WM	WT/ WT	WM/ WM	0,14	0,037
	Oui	1/42	41/42	0	2,38	97,61	0		
	Non	9/61	52/61	0	14,75	85,24	0		

L'ensemble des patients qui portent une mutation du gène *CARD15/NOD2* sont au nombre de 27. Une association significative entre la présence d'une mutation du gène *CARD15/NOD2* et le facteur du tabagisme dans l'apparition de la MC est notée (p-value= 0,0013 et OR=0,17). Cependant le faible échantillonnage de notre étude ne permet pas de tirer une conclusion. Une liaison positive entre la mutation du gène *CARD15/NOD2* et le statut tabagique chez les patients atteints de la MC est confirmé dans d'autres études (De Diego *et al.*, 2006 ; Helbig *et al.*, 2012).

En outre, les résultats des autres études qui ont été réalisées sur les populations : américaine, espagnole et allemande n'ont pas signalés d'association significative entre les mutations du gène *CARD15/NOD2* et le tabac (Brant *et al.*, 2003 ; Alvarez-Lobos *et al.*, 2005 ; Niess *et al.*, 2012).

6.2. Facteurs alimentaires

Les habitudes alimentaires pourraient expliquer les différences de risque de développer une MC puisque certains déterminants antigéniques alimentaires constituent avec les bactéries la plus grande source d'antigène au contact de la muqueuse intestinale.

Par ailleurs, l'alimentation qui a profondément changé ces 50 dernières années, est probablement le facteur influençant le plus important dans la composition et l'activité

Résultats et discussion

métabolique de la microflore intestinale et agissant indirectement sur les interactions hôte/agent(s) bactérie(s)/réponse immunitaire (Andersan *et al.*, 2012).

Dans notre échantillon, la plus part des patients (environ 80%) déclenche la MC à cause d'une intoxication alimentaire. Ceci peut être expliqué par plusieurs hypothèses suggérant que le régime pauvre en fibre (légumes et fruits), surconsommation de sucres raffinés, de graisse et de protéines animales, de margarine, de fast-food, de graisse cuites, de microparticules et chaîne du froid non respectée, exposent à un risque élevé de MC mais aucun n'a été formellement identifié (Ekbohm, 2004 ; Carbonnel *et al.*, 2009 ; Cortot *et al.*, 2009)

6.3. Facteurs psychologiques : stress

Environ la moitié des patients souffrant de MICI attribuent le développement de leur maladie à un problème psychosocial ou à un trait de leur personnalité, entretenant ainsi l'idée non fondée d'une origine psychosomatique de l'affection (Cortot *et al.*, 2007).

Dans notre enquête, nous avons posé la question aux 32 patients sur le facteur qui a pu déclencher la MC. Parmi ces patients, le stress est retrouvé chez 40,62% des cas.

Une étude française récente a montré ; en analyse univariée ; que le nombre d'évènements de vie stressants était plus élevé dans les mois précédant la survenue d'une MC. Toutefois, en analyse multi-variée, cette augmentation n'était plus un facteur indépendant de survenue de la maladie, car il était influencé notamment par les niveaux de dépression et d'anxiété du patient (Lerebours *et al.*, 2007). Cette étude confirme un résultat antérieur obtenu au Danemark, ayant montré qu'en cas d'évènements de vie majeurs (décès d'un enfant), la survenue ultérieure de la MC n'était pas augmentée.

Une dizaine d'études prospectives ont cherché à savoir si la survenue d'un stress ou la façon de le gérer était associée aux poussées de MC ; elles ont été revues par Maunder en 2005, elles montrent que le plus souvent l'évolution de MC n'est pas influencée par le stress. De plus, il n'y a pas de bénéfice thérapeutique sur l'évolution des MICI au cours des essais visant à réduire le stress (psychothérapie, relaxation, ...). Un état dépressif ou anxieux est plus fréquemment noté chez les patients porteurs de MICI lors des poussées que dans la population générale; il serait peut être tout simplement une conséquence de la maladie et fonction du degré de sévérité. Donc sa présence altère la qualité de vie et pourrait influencer négativement l'évolutivité de la maladie, comme pour d'autres affections.

Chez l'animal, le stress et l'induction d'un état dépressif peuvent aggraver ou réactiver une colite chimiquement induite. Le stress peut modifier la production de mucus et la perméabilité

Résultats et discussion

colique; il peut même générer des altérations épithéliales, favoriser l'adhésion et la pénétration des bactéries et entraîner une inflammation muqueuse avec infiltrat cellulaire (Qiu *et al.*, 1999).

7. Influence du sexe

Dans la population de patients, nous observons que l'allèle muté « C » du polymorphisme G908R, est légèrement prédominant chez les femmes par rapport aux hommes (13,8% et 8,9%) (Tableau 42), sauf dans le cas de la mutation 1007fs pour laquelle les hommes sont en plus grand nombre (13,33% et 6,9%), alors qu'avec le polymorphisme R702W aucune différence n'est notée (H : 4,44% et F : 5,17%).

Tableau 42: Répartition du polymorphisme selon le sexe

Mutation	Sexe	Effectif (n)			Pourcentage (%)			OR	p-value
		GC	GG	CC	GC	GG	CC		
G908R	H	4/45	41/45	0	8,9	91,11	0	0,61	0,44
	F	8/58	50/58	0	13,8	86,20	0		
R702W		CT	CC	TT	CT	CC	TT	0,21	0,86
	H	2/45	43/45	0	4,44	95,55	0		
	F	3/58	55/58	0	5,17	94,82	0		
1007fs		WT/WM	WT/WT	WM/WM	WT/WM	WT/WT	WM/WM	2,08	0,27
	H	6/45	39/45	0	13,33	86,66	0		
	F	4/58	54/58	0	6,9	93,10	0		

La prédominance du sexe féminin bien que faible se retrouve également dans la population de la région du centre de l'Algérie (Boukercha *et al.*, 2015), ce même résultat est retrouvé dans la population du Québec (Vermeir *et al.*, 2002), la population finlandaise (Hélio *et al.*, 2002), la population espagnole (De Diegot *et al.*, 2006), la population allemande (Niess *et al.*, 2012) et Polonaise (Salkic *et al.*, 2015).

Résultats et discussion

Une forte prédominance du sexe féminin chez les patients NOD+ est observée dans une autre étude qui a été réalisée sur la population de Berlin (H :31,25 et F :68,75) (Buning *et al.*, 2004), au contraire de Tekin et al (2009), qui rapportent une forte prédominance du sexe masculin chez les patients porteurs d'une mutation du gène *CARD15/NOD2* (H : 72,72% et F :27,27%). Cette prédominance est caractérisée dans une cohorte de la population bosnienne, avec 100% des patients masculins porteurs de la mutation et aucune femme n'a été notée (Salkic *et al.*, 2015).

Dans une étude qui a été réalisée sur une population italienne, une légère prédominance du sexe masculin a été notée chez les patients porteurs du génotype hétérozygote composé (H :52,08% et F : 47,92%) (Rigoli *et al.*, 2008).

8. Prédisposition familiale

Dans notre échantillon, 29 patients présentent un ou plus d'un apparenté au 1^{er} ou 2^{ème} degré atteint de la MC. Cependant, parmi ces patients un seul porte l'allèle muté « C » du polymorphisme G908R, un autre l'allèle muté « T » dans R702W et deux patients portent l'allèle muté du polymorphisme 1007fs (Tableau 43).

Tableau 43: Corrélation entre le polymorphisme et les antécédents familiaux

Mutation	Antécédents familiaux	Effectif (n)			Pourcentage (%)			OR	p-value
		CT	CC	TT	CT	CC	TT		
R702W	Oui	1/29	28/29	0	3,45	96,55	0	0,63	0,67
	Non	4/74	70/74	0	5,40	94,59	0		
G908R		GC	GG	CC	GC	GG	CC	0,20	0,10
	Oui	1/29	28/29	0	3,45	96,55	0		
	Non	11/74	63/74	0	14,86	85,13	0		
1007fs		WT/ WM	WT/ WT	WM/ WM	WT/ WM	WT/ WT	WM/ WM	0,61	0,54
	Oui	2/29	27/29	0	6,90	93,10	0		
	Non	8/74	66/74	0	10,81	89,18	0		

On constate à travers ce résultat que dans cette cohorte le facteur héréditaire n'apparaît pas. Cependant dans une prospection que j'ai réalisée récemment dans la wilaya de Batna, un

Résultats et discussion

grand nombre de cas familiaux est en cours d'étude, cet aspect de l'hérédité de la pathologie pourrait s'expliquer par l'influence du fort taux de consanguinité dans la région.

Aucune significativité n'a été indiquée dans une étude sur une cohorte d'Alger ($p=0,28$). Les mêmes observations ont été pareillement notées dans la population espagnole (De Diego *et al.*, 2006), la population du Québec (Vermeir *et al.*, 2002), italienne (Giachino *et al.*, 2002), en Finlande (Helio *et al.*, 2002) et en Allemagne (Buning *et al.*, 2004).

Brant *et al.* (2003), ont rapporté une forte prédominance des cas familiaux, chez les patients porteurs (homozygote et hétérozygote pour les trois polymorphismes), 91,26% dans une population juive américaine mais sans aucune association significative entre le gène *CARD15/NOD2* et la prédisposition familiale de la MC.



Discussion générale

Discussion générale

L'objectif de ma thèse a été de caractériser les polymorphismes du gène *CARD15/NOD2* et d'étudier leur éventuelle implication dans la prédisposition génétique à la MC. L'estimation précise des variations génétiques dans la population malade rapportées à la population générale permettrait la compréhension des conséquences physiopathologiques.

Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en place l'analyse par PCR-RFLP des mutations du gène candidat, permettant d'obtenir des indicateurs de la diversité génétique au locus *IBD*: trois variants génétiques de *CARD15/NOD2* ont été rapportés associés à la MC, deux mutations faux-sens non conservatrices (R702W et G908R) et une mutation décalante (L1007fsinsC). Environ trente pour cents des malades atteints de MC portent au moins une de ces mutations, contre 10% dans la population contrôle. La fréquence allélique calculée pour chaque variant donne 11,65 (G908R), 4,85 pour (R702W) et 9,71% pour (1007fs), la prévalence de ces mutations est influencée par les caractères ethniques et géographique des populations d'études. Ainsi, en Italie, une étude réalisée à l'université de Missina avait retrouvé une fréquence de 74,7% (n=133), la fréquence allélique de la variante 1007fs était de 9,8% vs 2,4% (p=0,001), elle était de 4,5% chez les patients Crohniens pour la variante G908R vs 4,3% chez le groupe contrôle (p= non significative), et de 9,8% pour la variante R702W vs 2,9% chez le groupe contrôle (p=0,002) (Rigoli *et al.*, 2008).

Mon travail a donc permis de préciser le niveau de polymorphisme du locus *IBD* posant ainsi les bases nécessaires pour l'étude des répercussions de la variation dans la survenue de la maladie, nos résultats indiquent une influence de ce gène sur la maladie.

Clinique : Au regard de la sévérité des manifestations de la maladie, la majorité des patients présentant un des variants alléliques montre une forme sténosante. Economou et al (2009) dans une méta-analyse, avait rapporté l'existence d'une association entre la mutation *CARD15/NOD2* et la forme sténosante de la maladie (OR=1,94 avec IC de 95%).

Contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature, notre étude montre une localisation iléocolique.

Beaucoup d'auteurs ont rapporté que la mutation 1007fs est la plus à risque. Les études de corrélation génotype/phénotype ont clairement établi que les patients mutés pour le gène *CARD15/NOD2* avaient un âge de début de maladie plus jeune de quelques années, qu'ils avaient plus souvent une atteinte iléo-colique, et que la maladie était plus souvent de type sténosant ou fistulisant, ces trois éléments caractérisent notre sous classe de patients, une association entre la gravité de la MC et le variant 1007fs a été objectivée. Il faut dire que la valeur prédictive positive des allèles identifiés est faible, ne permettant pas de dépister des populations à risque.

Discussion générale

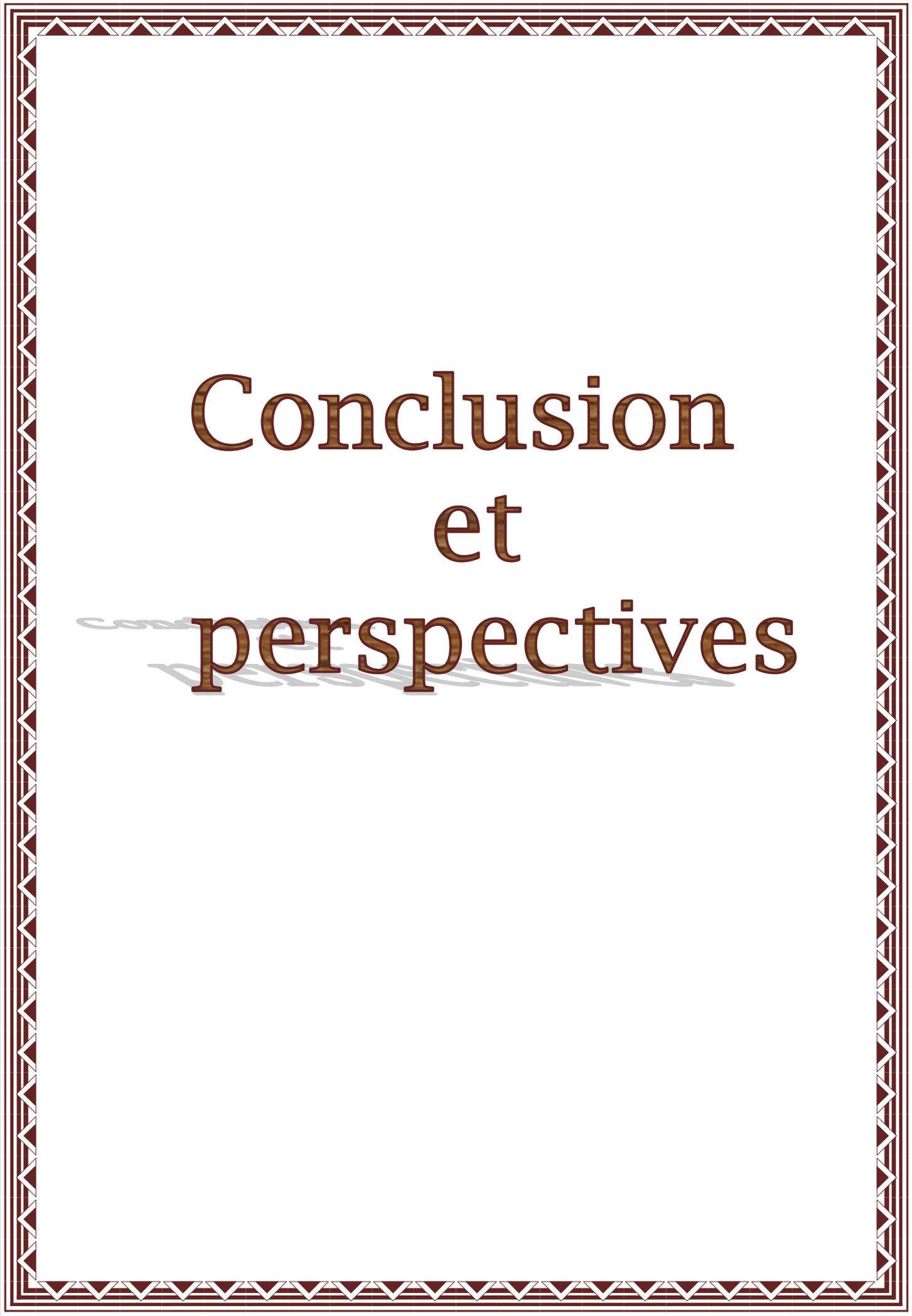
De nombreux auteurs ont émis l'hypothèse que la susceptibilité à développer la maladie est sous le contrôle d'un gène majeur, représenté par *CARD15/NOD2* mais son action est modulée par un système polygénique et des facteurs de milieu.

Il existe de nombreux facteurs environnementaux, auxquels sont exposés les patients atteints de MC, connus pour aggraver l'inflammation ou augmenter le risque de rechute, notamment l'alimentation, le tabac, les médicaments ou encore le stress (Carvalho *et al.*, 2008; Bailey *et al.*, 2011). En effet, l'existence d'un terrain affaibli et d'une inflammation préexistante peut augmenter le risque de survenue de la pathologie.

L'impact négatif du tabagisme actif a été bien décrit dans la MC : il multiplie environ par deux le risque de développer une MC, accroît la sévérité de cette maladie avec un recours plus fréquent aux immunosuppresseurs et à la chirurgie, augmente le risque de récurrence après chirurgie de résection, le risque de formes compliquées, fistulisantes péri-anales et diminue la réponse aux médicaments.

En effet, le tabac influencerait le phénotype et la localisation de la maladie dans les fratries et chez des jumeaux (Orholm *et al.*, 2000; Bridger *et al.*, 2002; Halfvarson *et al.*, 2003). De plus, le tabac semble associé à une plus forte localisation iléale de la maladie chez les fumeurs atteints de MC (Lindberg *et al.*, 1992; Russell *et al.*, 1998).

Par ailleurs, Verschuere *et al.* (2011) ont montré que l'exposition chronique à la fumée de cigarette induit des changements immunitaires au niveau de l'iléon qui pourraient augmenter la sensibilité iléale à l'inflammation. Ces études semblent donc indiquer que la fumée de cigarette aurait un effet délétère sur l'inflammation au niveau de l'intestin grêle, ce qui n'a jamais été testé. En résumé le tabac reconnu comme facteur aggravant.



Conclusion
et

perspectives

Conclusion et perspectives

La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin qui se caractérise par une alternance de phases de poussées et de rémission. Elle est multifactorielle et sa physiopathologie est influencée par une susceptibilité génétique. Les symptômes de cette maladie ont un impact important sur la qualité de vie des patients et son évolution est souvent grave et peut aboutir à un cancer du côlon. Tous les mécanismes qui provoquent cette maladie ne sont pas encore tous élucidés. Notre étude a permis de soulever quelques caractéristiques épidémiologiques et anatomo-cliniques de la MC de la population d'East Algérie, qui ne diffère pas en globalité des autres séries nationales et mondiales.

Au cours des dix dernières années, les progrès apportés aux techniques de génotypage à large échelle, la meilleure connaissance de l'architecture du génome humain réalisés par des études de larges cohortes de malades atteints de la MC ont permis d'identifier plusieurs dizaines de gènes et de loci associés à cette maladie. Le but de notre étude était donc d'explorer les mutations récurrentes du gène *CARD15/NOD2*.

Notre étude de corrélation génotype/phénotype ont clairement établi que les patients mutés pour le gène *CARD15/NOD2* avaient un âge de début de maladie plus jeune de quelques années, qu'ils avaient plus souvent une atteinte iléale, et que la maladie était plus souvent de type sténosant ou fistulisant pour la mutation 1007fsinsC la plus à risque. Le polymorphisme R702W a révélé une association significative avec la survenue de la MC dans notre série. La mutation du *CARD15/NOD2* est associé avec la localisation iléo-colique et la forme sténosante des lésions. Ces résultats doivent être confirmés par d'autres analyses moléculaires sur un échantillon plus grand. Le contexte génétique semble avoir une part importante dans la physiopathologie de la MC dans notre population d'étude, vue la fréquence élevée des antécédents familiaux et des mutations *CARD15/NOD2*. Ce gène reste à ce jour le facteur génétique le plus important de la MC, cependant en pratique clinique, il n'y a actuellement aucune indication à rechercher la présence des mutations du gène *CARD15/NOD2* ou d'autres gènes ni chez les malades ou leurs parents, ni en cas de suspicion de MC. Les parents de sujets atteints de MC peuvent être prévenus du sur risque qu'ils courent afin de consulter précocement en cas de symptômes digestifs évocateurs. Aucune action préventive ne peut être actuellement proposée aux patients à haut risque de développer la pathologie, si ce n'est des mesures anti-tabac : la faisabilité et le coût/bénéfice d'un screening multigénique des patients à risque, devront être évalués.

Il n'en demeure pas moins que la découverte de nouveaux mécanismes est primordiale pour l'exploration de nouvelles voies de traitement. La réalisation d'un registre national des MICI

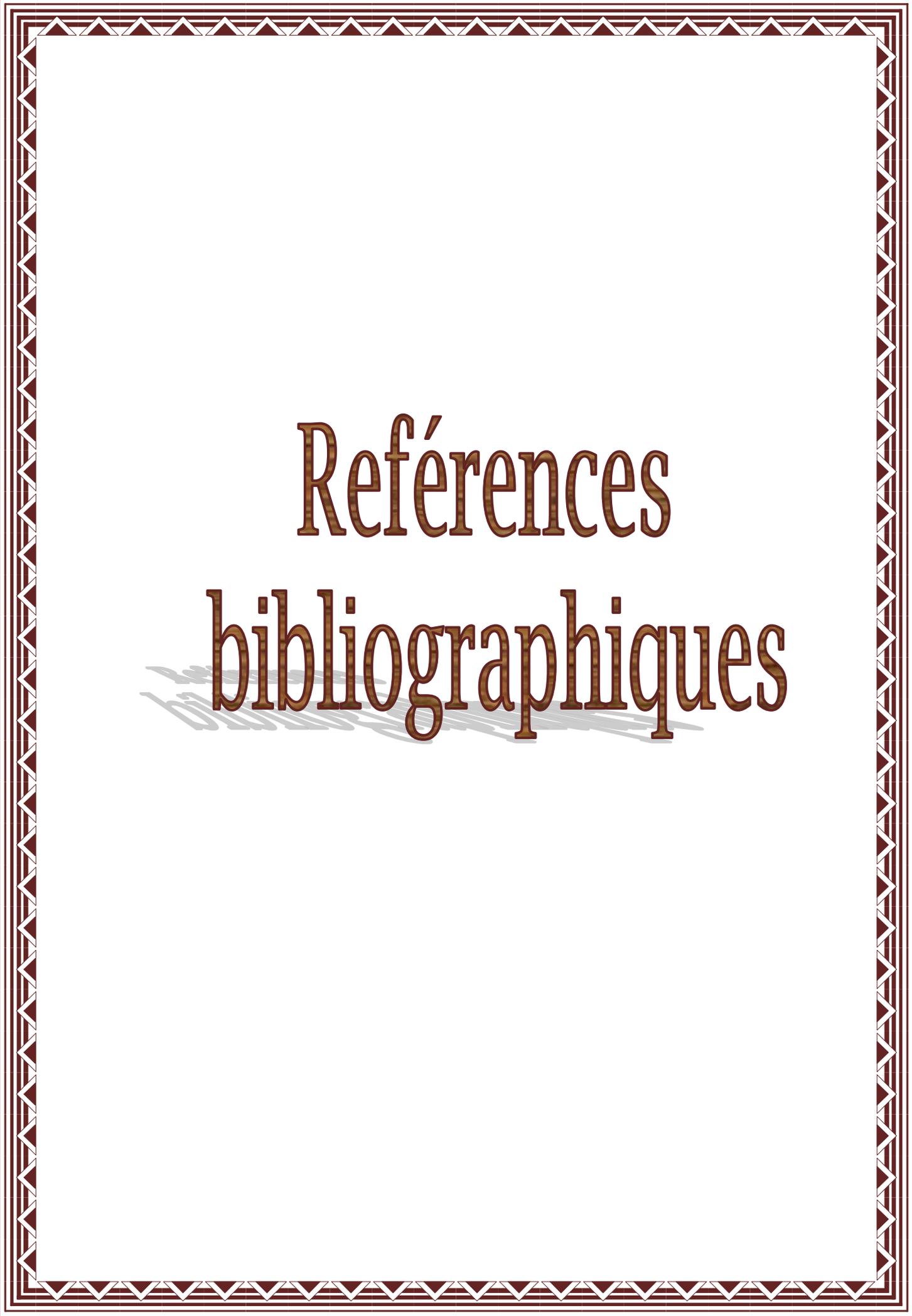
Conclusion et perspectives

s'avère nécessaire et permettra non seulement de bien connaître les paramètres épidémiologiques de ces affections, mais aussi d'optimiser leur prise en charge.

En outre, il est nécessaire d'avoir recours à de grandes études épidémiologiques pour pouvoir détecter des associations entre les différentes mutations et leur répercussion au niveau pathologique.

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

- élargissant notre étude sur un nombre plus important de patients afin de mieux asseoir les corrélations génotype-phénotype.
- étudiant les trois polymorphismes du gène *CARD15/NOD2* chez les cas familiaux.
- analysant l'interaction des différents variants génétiques entre eux et avec l'environnement.
- étudier les autres gènes impliqués dans la MC, comme : *ATG16L1*, *IRGM*, *IL23R* et le gène *TLR4*, en prenant en considération les facteurs environnementaux, géographiques et ethniques



Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abraham C, Cho JH. Functional Consequences of NOD2 (CARD15) Mutations. *Inflamm Bowel Dis.* 2006; 12: 641-650.

Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers C J, Vasiliauskas EA, Kam LY, Rojany M, Papadakis K A, Rotter JI, Targan SR, Yang H. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2002;123:679-88.

Al-Sulaiman R, Ismail M, Yasawy M, Al-Ateeq S, Abdelrashid M, Hussameddin AM, Al-Nafie A, Al-Ali AK, Akhtar MS, Al-Quorain AA. Association of NOD2/CARD15, DLG5, OCTN1 and Toll-like Receptor 4 Gene Polymorphisms with Inflammatory Bowel Disease: A University Hospital Experience. *Saudi Journal of Medicine & Medical Sciences.* 2014; 2: 81-85.

Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, Tassies D, Plaza S, Delgado S, Lacy AM, Pique JM, Yagüe J, Panés J. Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. *Ann Surg.* 2005; 242:693-700.

Ananthakrishnan AN, Huang H, Nguyen DD, Sauk J, Yajnik V, Xavier RJ. Differential Effect of Genetic Burden on Disease Phenotypes in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: Analysis of a North American Cohort. *Am J Gastroenterol.* 2014; 109: 395-400.

Anderson JL, Edney RJ, Whelan K. faecal Faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics.* 2012 ; 36 (6) : 503-516.

Annese V, Lombardi G, Perri F, D'Incà R, Ardizzone S, Riegler G, Giaccari S, Vecchi M. Variants of CARD15 are Associated with an Aggressive Clinical Course of Crohn's Disease—An IG-IBD Study. *The American Journal of Gastroenterology.* 2005;100: 84-92.

Références bibliographiques

Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, Fennell J, Smith BRK, MacKinlay E, Morecroft J, Anderson N, Kelleher D, O'Sullivan M, McManus R, Satsang J. NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe?. *Genes Immun.* 2004;5(5):417-425.

Azzam N, Nounou H, Alharbi O, Aljebreen A, Shalaby M. CARD15/NOD2, CD14 and Toll-Like 4 receptor gene polymorphisms in Saudi patients with Crohn's disease. *In J Mol Sci.* 2012; 13: 4268-4280.

Balamane A, Smail N, Benhabyles A. Quelques données épidémiologiques de la maladie de Crohn à Alger. Réunion de Consensus sur la Maladie de Crohn. 2013.

Baptista ML, Amarante H, Picheth G, Sdepanian LV, Peterson N, Babasukumar U, Lima HC, Kugathasan S. CARD15 and IL23R influences Crohn's Disease susceptibility but not disease phenotype in a Brazilian population. *Inflamm. Bowel. Dis.* 2008;14: 674-679.

Barmada MM, Brant SR, Nicolae DL, Achkar JP, Panhuysen C, Bayless T, Cho J, Duerr RH. A genome scan in 260 inflammatory bowel disease-affected relative pairs, *Inflamm Bowel Dis.* 2004;10:15-22.

Baugmart D, sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet.* 2012; 380: 1590-1605.

Beau P, Gay G, Arpurt P, Boustiere C, Boyer J, Canard M, Dalbies A, Escourrou J, Greff M, Lapuelle J, Laugier R, Letard JC, Marchetti B, Napoleon B, Palazzo L, Ponchon T, Sautereau D, Vedrenne B. Place de l'endoscopie dans le bilan de la maladie de Crohn. *Acta Endoscopica,* 2004; 34: 439-440.

Benedini V, Corazza N, Rossi Z, Fornaciari G, Cottone M, Frosini G, Caruggi M, Ottolini C, Colombo G. Burden of Crohn's disease: economics and quality of life aspects in Italy. *Clinicoecon Outcomes Res.* 2012; 4: 209-218.

Bhullar M, Macrae F, Brown G, Smith M, Sharpe K. Prediction of Crohn's disease aggression through NOD2 /CARD15 gene sequencing in an Australian cohort. *World J Gastroenterol.* 2014; 20:5008-5016.

Références bibliographiques

Bister G. physiopathologie de la maladie de Crohn rôle du microbiote. Université de Lorraine. 2014.

Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, Chen FF, Foster SJ, Duerr RH, Brant SR, Cho JH, Nuñez G. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology*. 2003;124(1):140-6.

Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010; 33(5):657-70.

Boualam F. UHP - Université Henri Poincaré. 2010.

Boudiaf M, Soyer P, Terem C, Pelage JP, Kardache M, Dufresne AC, Rymer AC. *J Radiol*. 2000; 81: 11-18.

Boukercha A, Mesbah-Amroun H, Bouzidi A, Saoula H, Nakkemouche M, Roy M, Hugot JP, Touil-Boukoffa C. NOD2 /CARD15 gene mutations in North Algerian patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(25): 7786-7794.

Bouladoux N, Hand TW, Naik S, Belkaid Y. Microbiote et lymphocytes T Les meilleurs ennemis. *m/s*. 2013 ; 29 (4) : 349-352.

Bounab N. Histoire naturelle de la maladie de Crohn. Etude prospective. 2011.

Bourgain C. Génomique, de la recherche à la clinique Questions autour d'un changement de perspective. *Med Sci*. 2014; 30:14-17.

Brand S, Konrad A, Crispin A, Göke B, Lohse P, Ochsenkühn T. The role of toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and CARD15/NOD2 Mutations in the susceptibility and phenotype of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11:645-652.

Références bibliographiques

Brant SR, Picco MF, Achkar JP, Bayless TM, Kane SV, Brzezinski A, Novet FJ, Bonen D, Karban A, Dassopoulos T, Karaliukas T, Beaty TH, Hanauer SB, Duerr RH, Cho JH. Defining complex contributions of NOD2/CARD15 gene mutations, age at onset, and tobacco use on Crohn's disease phenotypes. *Inflamm Bowel Dis.* 2003;9:281-289.

Bridger S, Lee JC, Bjarnason I, Jones JE, Macpherson AJ. In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis. *Nature.* 2002 ;51(1):21-5.

Bunning C, Genschel J, Buhner S, Kruger S, Kling K, Dignass A, Baier P, Bochow B, Ockenga J, Schmidt HJ, Lochs H. Mutation in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal restriction and are a risk factor for reoperation. *Aliment pharmacol ther.* 2004;19:1073-1078.

Burisch J, Munkholm P. Inflammatory bowel disease epidemiology. *Curr Opin Gastroenterol.* 2013; 29:357-362.

Carbonnel F, Jantchou P, Monnet E, Cosnes J. Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis: an update. *Gastroentérologie Clinique et Biologique.* 2009 ; 33 (3) : S145-S157.

Carvalho F, Barnich N, Sauvanet P, Darcha C, Gelot A, Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease-associated Escherichia coli LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin. *Inflamm Bowel Dis.* 2008; 14(8): 1051-60.

Casanova J-L, Abel L. Revisiting Crohn's disease. 2014. Immunodeficiency of macrophages. *J Exp Med.* 2009; 206: 1839-1843.

Cavanaugh J. NOD2: Ethnic and geographic differences. *World J Gastroenterol.* 2006, 12: 3673-3677.

Chamaillard M, Desreumaux P. Régulation de l'immunité intestinale par Nod2. *Gastroentérologie Clinique et Biologique.* 2004 ; 28 (11): 1189-1191.

Références bibliographiques

Chouraki V, Turck D, Colombel J.-F, Gower-Rousseau C. The changing epidemiology of paediatric inflammatory bowel disease: authors' reply. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2011;33(12) : 1381-1382.

Chua KH, Ng CC, Hilmi I, Goh KL. Co-inheritance of variants/ mutations in Malaysian patients with Crohn's disease. *Genet Mol Res*. 2012; 11:3115-3121.

Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, Ferguson DJ, Campbell BJ, Jewell D, Simmons A. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med*. 2010;16(1):90-7.

Corridoni D, Arseneau KO, Cominelli F. Functional defects in NOD2 signaling in experimental and human Crohn disease. *Gut Microbes*. 2014; 5 (2): 340-344.

Cortot A, Pineton GC, Vernier-Massouille G, Vigneron B, Rousseau CG: Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : maladies génétiques ou de l'environnement ?
Gastroenterologie clinique et biologique. 2009 ; 33 :681-691.

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

Csöngéi V, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Magyar L, Faragó B, Bene J, Sarlós P, Lakner L, Baricza E, Szabó M, Rappai G, Melegh B. Interaction of the major inflammatory bowel disease susceptibility alleles in Crohn's disease patients. *World J Gastroenterol*. 2010; 16(2): 176-183.

Curran ME, Lau KF, Hampe J, Schreiber S, Bridger S, Macpherson AJS, Cardon LR, Sakul H, J.R. Harris T, Stokkers P, . Deventer SJ.H, Mirza M, Raedler A, Kruis W, Meckler U, Theuer D, Herrmann T, Gionchetti P, Lee J, Mathew C, Lennard-Jones J Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16. *Gastroenterology* .1998 ; 115 (5): 1066-1071.

Références bibliographiques

Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, Mascheretti S, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002; 122:867–874.

Dalibon P. Maladie de Crohn et rectocolite ulcéro-hémorragique, de grandes similitudes. *Actualités Pharmaceutiques*, 2015; 54 (545): 20-24.

De Diego C, Alcantara M, Valle J, Pérez-grueso MJ, Muñoz-Rosas C, Carrobles JM, Martínez-Castro P. Frequency of CARD15 polymorphisms in patients with Crohn's disease from Toledo, Spain: Genotype-Phenotype Correlation. *Genetic Testing*. 2006, 10: 178-85.

Derakhshan F, Naderi N, Farnood A, Firouzi F, Hbib M, Rezvany MR, Javeri A, Bahari A, Balaii H, Ghaffarzadeh MR, Aghazadeh R, Zali MR. Frequency of three common mutations of CARD15/NOD2 gene in Iranian IBD patients. *Indian J Gastroenterol*, 2008; 27: 8-11.

Economou M, Zambeli E, Michopoulos S. Incidence and prevalence of Crohn's disease and its etiological influences. *Annals of Gastroenterology*. 2009; 22 (3) :158-167.

Ekbohm A. The epidemiology of IBD: a lot of data but little knowledge. How shall we proceed?. *Inflamm Bowel Dis*. 2004; 10:S32-4.

Elazzaoui Z. Les aspects épidémiologiques des MICI dans une population marocaine (a propos de 300 cas) expérience d'un service d'hépatogastro-entérologie du CHU Ibn-Sina de Rabat. 2012.

Franke A, McGovern D, Barrett J. Meta-Analysis Increases to 71 the Tally of Confirmed Crohn's Disease Susceptibility Loci. *Nat Genet*. 2010; 42: 1118-1125.

Frolkis A, Dieleman LA, Barkema HW, Panaccione R, Ghosh S, Fedorak RN, Madsen K, Kaplan GG. Environment and the inflammatory bowel diseases. *Can J Gastroenterol*. 2013;27(3):18-24.

Références bibliographiques

Gazouli M, Pachoula L, Panayotou L, Mantzaris G, Chrousos G, Anagnou NP, Roma-Giannikou E. NOD2/CARD15, ATG16L1 and IL23R gene polymorphisms and childhood-onset of Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2010; 16:1753-1758.

Giachino D, Duist MM, Regazzoni S, Gregori D, Bardessono M, Salacone P, Scaglione N, Sostegni R, Sapone N, Bresso F, Sambataro A, Gaia E, Pera A, Astegiano M, Marchi MD. Analysis of the CARD15 variants R702W, G908R and L1007fs in Italian IBD patients. *European Journal of Human Genetics.* 2004; 12: 206-212.

Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti P. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends in immunology.* 2003; 24 (12): 652-658.

Glas J, Konrad A, Schmechel S, Dambacher J, Seiderer J, Schroff F, Wetzke M, Roeske D, Török HP, Tonenchi L, Pfennig S, Haller D, Griga T, Klein W, Epplen JT, Folwaczny C, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Mussack T, Folwaczny M, Müller-Myhsok B, Brand S. The ATG16L1 gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to Crohn's disease in the German population. *Am J Gastroenterol.* 2008;103: 682-691.

Glasser A, Lapaquette P, Darfeuille-Michaud A. Altération de l'autophagie chez les patients atteints de maladie de Crohn Une porte ouverte pour des bactéries invasives?. *M/S.* 2009;25(4):349-351.

Goodhand JR, Wahed M, Mawdsley JE, Farmer AD, Aziz Q, Rampton DS. Mood disorders in inflammatory bowel disease: relation to diagnosis, disease activity, perceived stress, and other factors. *Inflamm Bowel Dis.* 2012; 18(12):2301-9.

Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Järnerot G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology.* 2003;124(7):1767-73.

Références bibliographiques

Hama I, Ratbi I, Reggoug S, Elkerch F, Kharrasse G, Errabih I, Ouazzani H, Sefiani A. Non-association of Crohn's disease with NOD2 gene variants in Moroccan patients. *Gene*. 2014; 4994: 121-123.

Hammada T, Lemdaoui C, Boutra F, Zoughailech D, Asselah H. Epidemiological aspect of inflammatory bowel disease in a Algerian population. *J Afr Hépatol Gastroentérol*. 2011; 5: 293-302.

Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher P JP, Mascheretti S, Jahnsen J, Moum B, Klump B, Krawczak M, Mirza MM, Foelsch UR, Vatn M, Schreiber S. Association of *NOD2* (*CARD15*) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet*. 2002;359: 1661-1665.

Hartman C, Eliakim R, Shamir R. Nutritional status and nutritional therapy in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2009; 15(21): 2570-2578.

Helbig LL, Nothnagel M, Hampe J, Balschun T, Nikolaus S, Schreiber S, Franke A, Nöthlings U. A case-only study of gene-environment interaction between genetic susceptibility variants in *NOD2* and cigarette smoking in Crohn's disease aetiology. *BMC Medical Genetics*. 2012;13:14.

Helio T, Halme L, Lappalainen M, Fodstad H, Paavola-Sakki P, Turunen U, Färkkilä M, Krusius T, Kontula K. *CARD15/NOD2* gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut*. 2003;52: 558-562.

Herfarth R. Update Imaging in Inflammatory Bowel Diseases. *Dig Dis*. 2013; 31: 345-400

Hovde Ø, Moum B. Epidemiology and clinical course of Crohn's disease: Results from observational studies. *World J Gastroenterol*. 2012; 18(15): 1723-1731.

Hrnčířová L, Krejsek J, Šplíchal I, Hrnčíř T. Crohn's disease: a role of gut microbiota and *Nod2* gene polymorphisms in disease pathogenesis. *ACTA MEDICA (Hradec Králové)*. 2014; 57(3): 89-96.

Références bibliographiques

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Bindert V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Marcry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of CARD15 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001; 411:599-603.

Hugot JP. CARD15/NOD2 mutations in Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1072:9-18.

Jantchou P, Monnet E, Carbonnel F. Les facteurs d'environnement dans la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (tabac et appendicectomie exclus). *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. 2006; 30:859-867.

Judge J, Giordano B. Crohn's Disease Masquerading as an Acute Abdomen. *Journal of Pediatric Health Care*. 2014; 28(5):444-450.

Jung C, Colombel J-F, Lemann M, Beaugerie L, Allez M, Cosnes J, Vernier-Massouille G, Gornet JM, Gendre JP, Cezard JP, Ruemmele FM, Turck D, Merlin F, Zouali H, Libersa C, Dieudé P, Soufir N, Thomas G, Hugot JP. Genotype/Phenotype Analyses for 53 Crohn's Disease Associated Genetic Polymorphisms. *PLoS ONE*. 2012; 7(12): e52223.

Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, Ollendorf D, Bousvaros A, Grand RJ, Finkelstein JA. The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5: 1424-1429.

Kaser A, Lee AH, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H, Nieuwenhuis EE, Higgins DE, Schreiber S, Glimcher LH, Blumberg RS. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*. 2008 5;134(5):743-56.

Kassem A, salem O, Ahmed I, Zakaria N, Elsayed A. Prevalence of CARD15/NOD2 among Egyptian crohn's disease patients and its relation to disease severity. *European Journal of Health*. 2014; 2 : 2052-5249.

Références bibliographiques

King K, Sheikh MF, Cuthbert AP, Fisher S, Onnie CM, Mirza M, Pattni RC, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Lewis CM, Roberts RG, Mathew CG. Mutation, selection, and evolution of the Cohn's disease susceptibility gene *CARD15*. *Human Mutation*. 2006; 27 : 44-54.

Klotz C, Dhooge M, Oudjit A, Barret M, Beuvon F, Chaussade S, Coriat R, Abitbol V. Prise en charge de la maladie de Crohn. *La Presse Médicale*. 2015 ; 44 (4) : 411-417.

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

Kugathasan S, Loizides A, Babusukumar U, McGuire E, Wang T, Hooper P, Nebel J, Koftman G, Noel R, Broeckel U, Tolia V. Comparative phenotypic and *CARD15* mutational Analysis among African American, Hispanic, and White children with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11: 631-638.

Laas MW, Roggenbuck D, Conrad K. Diagnosis and classification of Crohn's disease. *Autoimmun Rev*. 2014;13: 467-471.

Larson S, Bendtzen K, Nielsen OH. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: epidemiology, diagnosis and management. *Ann Med*. 2010; 42: 97-114.

Leong WL, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, Sung JJYL. NOD2/*CARD15* gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;17:1465-1470.

Lerebours E, Gower-Rousseau C, Merle V, Brazier F, Debeugny S, Marti R, Salomez JL, Hellot MF, Dupas JL, Colombel JF, Cortot A, Benichou J. Stressful life events as a risk factor for inflammatory bowel disease onset: A population-based case-control study. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(1):122-31.

Leroubours E, Savoye G, Guedon C. Epidémiologie et histoire naturelle des MICI *Gastroenterol Clin Biol*. 2003; 27 :1S76-1S80.

Références bibliographiques

Lesage S, Zouali H, Cézard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS. *CARD15/NOD2* Mutational Analysis and Genotype-Phenotype Correlation in 612 Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Am J Hum Genet.* 2002; 70: 845-857.

Li M, Gao X, Guo CC, Wu KC, Zhang X, Hu PJ. OCTN and CARD15 gene polymorphism in Chinese patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008; 14: 4923-4927.

Liu J, Anderson C. Genetic studies of Crohn's disease: Past, present and future. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 2014; 28: 373-386.

Loftus EV, Jr Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology.* 2004;126: 1504-17.

Long WY, Chen L, Zhang CL, Nong RM, Lin MJ, Zhan LL, Lv XP. Association between NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in Chinese Zhuang patients. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 4737-4744.

Louis E, Collard A, Oger AF, Degroote E, Aboul Nasr El Yafi F, Belaiche J. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut.* 2001; 49:777-82.

Louis E, Kemseke CV, Latour P, Aiche JB, Naers CR. Génétique et environnement dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Rev Med Liège.* 2012; 67: 5-6 : 298-304.

Ma MY, Ma ZB, Xu HY, Zhao JB, Li Y, Gao M. Effect of promoter polymorphism of organic cation transporter OCTN1/2 on the susceptibility to Crohns disease: a Meta-analysis. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2013;34(3):285-9.

Maev IV, Andreev DN, Role of Mutations in NOD2/CARD15, ATG16L1, and IRGM in the Pathogenesis of Crohn's Disease, *Inter J Bio Medicin.* 2014; 4: 7-10.

Références bibliographiques

Magalhaes JG, Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Travassos LH, Selvanantham T, Girardin SE, Gommerman JL, Philpott DJ. Nod2-dependent Th2 polarization of antigen-specific immunity. *J Immunol.* 2008;181(11):7925-35.

Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature.* 2011; 474: 298-306.

Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature.* 2011; 474(7351):298-306.

Matricon J. Immunopathogénèse des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Médecine/Sciences.* 2010 ; 26 : 405-10.

Maunder RG. Evidence that stress contributes to inflammatory bowel diseases: evaluation, synthesis, and future directions. *Inflamm Bowel Dis.* 2005; 11: 600-608.

Meddour Y, Chaiba S, Bouseloubb A, Kaddachec N, Kecilic L, Gamarc L • [M. Nakkemouche](#),

• [R. Didjik](#) ¹ ,

• [M.C. Abbadi](#) ² ,

• [D. Charron](#) ,

• [T.E. Boucekkine](#) ,

• [R. Tamouza](#) **et al.** NOD2/CARD15 and IL23R genetic variability in 204 Algerian Crohn's disease Y. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology.* 2014; 558: 6.

Medrano LM, Taxonera C, González-Artacho C, Pascual V, Gómez-García M, Barreiro-de Acosta M, Pérez-Calle JL, Bermejo F, López-Sanromán A, Martín Arranz D, Gisbert JP, Mendoza JL, Martín J, Núñez C, Urcelay E. Response to Infliximab in Crohn's Disease: Genetic Analysis Supporting Expression Profile. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015:318-207.

Mendoza JL, Murillo LS, Fernández L, Peña AS, Lana R, Urcelay E, Cruz-Santamaría DM, Concha EG, Díaz-Rubio M, García-Paredes J. Prevalence of

Références bibliographiques

mutations of the NOD2/CARD15 gene and relation to phenotype in Spanish patients with Crohn disease. *Scand J Gastroenter.* 2003;38:1235-1240.

Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review, *Gastroenterology.* 2012;142 (1):46-54.

Murthy A, Li Y, Peng I, Reichelt M, Katakam AK, Noubade R, Roose-Girma M, DeVoss J, Diehl L, Graham RR, Lookeren CM. A Crohn's disease variant in Atg1611 enhances its degradation by caspase 3. *Nature.* 2014;506 (7489):456-62.

Naser SA, Arce M, Khaja A, Fernandez M, Naser N, Elwasila S, Thanigachalam S. Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2012;18(5):412-24.

Niess JH, Klaus J, Stephani J, Pflüger C, Degenkolb N, Spaniol U, Mayer B, Lahr G, Boyen GBT. NOD2 Polymorphism Predicts Response to Treatment in Crohn's Disease—First Steps to a Personalized Therapy. *Dig Dis Sci.* 2012; 57: 879-886.

Nunez C, Barreiro M, Dominguez-Munoz JE, Lorenzo A, Zapata C, Pena S. CARD15 mutations in patients with Crohn's disease in a homogeneous Spanish population. *Am J Gastroenterol.* 2004;99:450-456.

Ogura Y, Bonen DK, Inohra N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kischner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001; 411: 603-606.

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

Références bibliographiques

Oudjit A, Koudjowa A, Bahurel H, Silvera S, Gouya H, Millischer A.-E, Augui J, Vignaux O, Sahut d'Izarn J.-J, Legmann P, Hoeffel C. Imagerie de la maladie de Crohn *EMC – Radiologie*. 2005 ;2 (3) : 237-255.

Ouyang Q, Tandon R, Goh K, Ooi CJ, Ogata H, Fiocchi C. The emergence of inflammatory bowel disease in the Asian Pacific region. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2005; 21: 408-413.

Pascoe L, Zouali H, Sahbatou M, Hugot JP. Estimating the odds ratios of Crohn disease for the main CARD15/NOD2 mutations using a conditional maximum likelihood method in pedigrees collected via affected family members. *European Journal of Human Genetics*. 2007; 15:864-871.

Pellestor F. Histologie de l'appareil digestif. universite de montpelier 1 faculte de medecine perianal fistulizing Crohn.s disease. *Dig Dis Sci*. 2008. 54; 1746-1752.

Peyrin-Biroulet L. Histoire naturelle de la maladie de Crohn. *Post'U*. 2011 ; 105-114.

Peyrin-Biroulet L, Parmentier-Decrucq E, Branche J, Desreumaux P. L'IL-23R, un nouveau gène de susceptibilité dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales. *Med Sci*. 2007 ; 23 : 250-252.

Philpott D, Sorbara MT, Robertson SJ, Croitoru K, Girardin SE. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2014;14:9-23.

Pierre-Lucas D. Maladie de crohn Mieux comprendre la maladie, son diagnostic et ses traitements afin d'en optimiser la prise en charge officinale. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Limoges. 2012.

Pillai P, Sobrin L. Blau syndrome-associated uveitis and the NOD2 gene. *Semin Ophthalmol*. 2013; 28 (5-6):327-32.

Références bibliographiques

Polito JM, Childs B, Mellits ED, Tokayer AZ, Harris ML, Bayless TM. Crohn's disease: influence of age at diagnosis on site and clinical type of disease. *Gastroenterology*. 1996;111(3):580-6.

Pollester F. Université Montpellier I. Faculté de Médecine de Montpellier –Nimes. 2013.

Poupardin C, Lémann M, Gendre JP, Sabaté JM, Marteau P, Chaussade S, Delchier JC [Jean-Marc Sabaté¹](#), [Philippe Marteau⁴](#), [Stanislas Chaussade⁵](#), [Jean-Charles Delchier⁶](#), [Yoram Bouhnik⁷](#), [Jean-Claude Chaput⁸](#), [Raoul Poupon⁹](#), [Jean-Claude Soulé¹⁰](#), [Yves Benhamou¹¹](#), [Jean-Didier Grangé¹²](#), [Benoît Coffin¹](#)**et al.** Efficacy of infliximab in Crohn's disease. Results of a retrospective multicenter study with a 15-month follow-up. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. 2006 ; 30 : 247-252.

Prideaux L, Kamm AM, De Cruz PP, Chan FKL, Siew C Ng. Inflammatory bowel disease in Asia: A systematic review. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2012 ; 27:1266-1280.

Pugazhendhi S, Amet A, Balamurugan R, Subramanian V, Ramakrishna B. Common NOD2 mutations are absent in patients with Crohn's disease in India. *Indian J Gastroenterol*. 2008;27:201-203.

Qiu BS, Vallance BA, Blennerhassett PA, Collins SM. Collins The role of CD4⁺ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. *Nature Medicine*. 1999; 5, 1178-1182.

Rehman A, Sina C, Gavrilova O, Häsler R, Ott S, Baines JF, Schreiber S, Rosenstiel P. Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut*. 2011; 60(10):1354-62.

Rigoli L, Romano C, Caruso RA, Lo Presti M A, Bella CD, Procopio V, Giudice GL, Amorini M, Costantino G, Sergi MD, Cuppari C, Calabro GE, Gallizi R, Salpietro CD, Fries W. Clinical significance of NOD2/CARD15 and Toll-like receptor 4 gene single nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World Gastroenterol*. 2008;14: 4454-4461.

Références bibliographiques

Riis L, Vind I, Vermeire S, Wolters F, Katsanos K, Politi P, Freitas J, Mouzas IA, O'Morain C, Ruiz-Ochoa V, Odes S, Binder V, Munkholm P, Moum B, Stockbrügger R, Langholz E. The prevalence of genetic and serologic markers in an unselected European population-based cohort of IBD patients. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2007;13 (1): 24-32.

Rogler G, The effects of NOD2/CARD15 mutations on the function of the intestinal barrier. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2007;1: 53-60.

Rosenstiel P, Schreiber S. NOD-Like Receptors—Pivotal Guardians of the Immunological Integrity of Barrier Organs. *Series Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2009;53: 35-47.

Russel MG, Dorant E, Volovics A, Brummer RJ, Pop P, Muris JW, Bos LP, Limonard CB, Stockbrügger RW. High incidence of inflammatory bowel disease in the Netherlands: results of a prospective study. The South Limburg IBD Study Group. *Dis Colon Rectum*. 1998; 41:33-40.

Salkic N, Adler G, Zawada A, Iwona Z, Alibegovic E, Karakiewicz B, Kozłowska-Wiechowska A, Wasilewicz M, Sulzyc-Bielicka V, Bielicki D. NOD2/CARD15 mutations in Polish and Bosnian populations with and without Crohn's disease: prevalence and genotype-phenotype analysis. *Bosn J Basic Med Sci*. 2015;15(2):67-72.

Saussure P, Bouhnik Y. Maladie de Crohn de l'adulte. *Elsevier Masson*. 2007; 9-057-G-10.

Schnitzler F, Friedrich M, Wolf C, Angelberger M, Diegelmann J, Olszak T, Beige F. The NOD2 p.Leu1007fsX1008 Mutation (rs2066847) Is a Stronger Predictor of the Clinical Course of Crohn's Disease than the FOXO3A Intron Variant rs12212067. *PLOS ONE*. 2014; 9 (11):108503.

Serghini M, Dabbebi H, Matri Samira, Ben Mustapha, Kallel L, Fekih M, Boubaker Jalel, Filali A. Prévalence et facteurs prédictifs du déficit en vitamine D au cours de la maladie de Crohn : résultats d'une étude prospective tunisienne. Livre des résumés des JFHOD. 2016.

Références bibliographiques

Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M. the EC-IBD Study Group Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south?. Results of the European collaborative study on inflammatory bowel disease (EC-IBD). *Gut*. 1996; 39: 690-697.

Staumont G. Prise en charge d'une localisation ano-périnéale (LAP) de Crohn à sa phase aiguë. *Post'U*. 2010; 9-20.

Strober W, Watanabe T. NOD2, an intracellular innate immune sensor involved in host defense and Crohn's disease. *Mucosal Immunology*. 2011; 4: 484-495.

Tanabe T, Chamillard M, Yasunori Ogura, Zhu L, Qiu S, Masumoto J, Ghosh P, Moran A, Predergast MM, Tromp G, Williams CJ, Inohara N, Núñez G. Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *The EMBO Journal*. 2004; 23: 1587-1597.

Tekin F, Berdeil A, Ozutemiz O, Aydın A, Musoglu A, Osmanoglu N, Iler T. Evaluation of the association of NOD/CARD15 gene polymorphisms with clinical course of Turkish Crohn's disease patients. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*. 2009; 1(5):211-214.

Tougeron D, Savoye G, Savoye Collet C, Koning E, Michot F, Lerebours E. Predicting factors of fistula healing and clinical remission after infliximab based combined therapy for perianal fistulizing Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 2009; 54(8):1746-52.

Tsai W, Huang D, Yu Y, Chen C, Lin W. Dual roles of NOD2 in TLR4-mediated signal transduction and -induced inflammatory gene expression in macrophages. *Cellular Microbiology*. 2011;13 (5) : 717-730.

Uyar FA, Over-Hamzaolgu H, Ture F, Gul A, Tözün N, Saruhan-Direskeneli G. Distribution of common CARD15 variants in patients with sporadic Crohn's disease case from Turkey. *Digestive Disease and Sciences*. 2006; 51:706-710.

Références bibliographiques

Vermeire S, Wild G, Kocher K, Kocher K, Cousineau J, Dufresne L, Alain Bitton, Langelier D, Pare P, Lapointe G, Cohen A, Daly MJ, Rioux JD. CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. *Am J Hum Genet.* 2002; 71: 74-83.

Vernier G, Cortat A, Gower R, Salomer J, Colombel J, Desreumaux J. Epidemiology and risk factors of inflammatory bowel diseases. *La revue du patricien.* 2005 ; 55 (9): 949-961.

Vernier–Massouille G, Balde M, Salleron J, Turck D, Dupas J, Mouterde O, Merle G, Salomez JL

[Turck D, Dupas JL, Mouterde O, Merle V, Salomez JL, Branche J, Marti R, Lerebours E, Cortot A, Gower-Rousseau C, Colombel JF et al.](#) Natural History of Pediatric Crohn's Disease: A Population-Based Cohort Study. *Gastroenterology.* 2008; 135 (4): 1106-1113.

Verschuere S, Bracke KR, Demoor T, Plantinga M, Verbrugghe P, Ferdinande L, Lambrecht BN, Brusselle GG, Cuvelier CA. Cigarette smoking alters epithelial apoptosis and immune composition in murine. *GALT.* 2011;91(7):1056-67.

Villani AC, Lemire M, Fortin G, Louis E, Silverberg MC, Collette C, Baba N, Libioulle C, Belaiche J, Bitton A, Gaudet D, Cohen A, Langelier D, Fortin PR, Wither JE, Sarfati M, Rutgeerts P, Rioux JD, Vermeire S, Hudson TJ, Franchimont D. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature Genetics.* 2008; 41:71-76.

Wei S, Ni Y, Yang H, Su Y, Chang M, Chang Y, Jium Shieh M. A hospital-based study of clinical and genetic features of Crohn's disease. *Journal of the Formosan Medical Association.* 2011 ;110 : 600-606.

Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2007; 448(7152): 427-34.

Références bibliographiques

Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Kazumori T, Nakamura Y. Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *J Hum Genet.* 2002; 47:469-472.

Zhang W, Hui KY, Gusev A, Warner N, Evelyn Ng, Ferguson J, Choi M, Burberry A, Abraham C, Mayer L, Desnick RJ, Cardinale CJ, Hakonarson H, Waterman M, Chowers Y, Karban A, Brant SR, Silverberg MS, Gregersen PK, Katz S, Lifton RP, Zhao H, Nuñez G, Pe'er I, Peter I, Cho JH. Extended haplotype association study in Crohn's disease identifies a novel, Ashkenazi Jewish-specific missense mutation in the NF- κ B pathway gene, HEATR3. *Genes and immunity.* 2013;14 (5): 310-316.

Zhou Z, Lin XY, Akolkar PN, Gulwani-Akolkar B, Levine J, Katz S, Silver J. Variation at NOD2/CARD15 in familial and sporadic cases of Crohn's disease in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97(12):3095-3101.

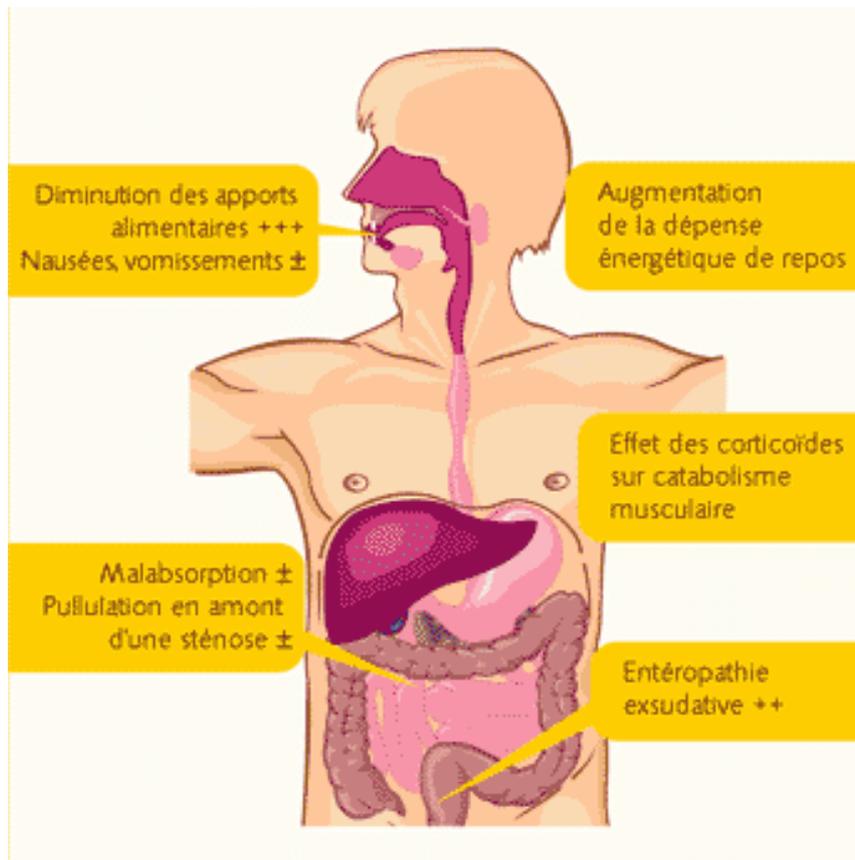
Zouiten-Mekki L, Zaouali H, boubaker J, Karaoui S, Fekih M, Matri S, Hamzaoui S, Filali A, Chaabouni H, Hugot JP, CARD15/NOD2 in a Tunisian population with Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 2005 ; 50 :130-135.

Zouiten-Mekki L, Serghini M, Fekih M, Kallel L, Matri S, Ben Mustapha N, Boubaker J, Filali A. Rôle de la cellule épithéliale dans l'homéostasie intestinale et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Med Sci.* 2013; 29 : 1145-1150

Annexes

Annexes

Annexe 1: Principaux facteurs étiologiques de la dénutrition au cours de la maladie de Crohn (Pierre-Lucas, 2012)



Annexe 2 : Complications extra-intestinales les plus communes des maladies chroniques intestinales aux Etats-Unis et en Europe (Larson *et al.*, 2010)

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

Annexes

Annexe 3 : Critères de diagnostic chez un patient suspecté d'être atteint de maladie de Crohn (Baugmart et Sandborn, 2012)

<u>Historique</u>	<p>Début des symptômes</p> <p>Sang et/ou mucus dans les selles</p> <p>Crampes intestinales</p> <p>Incontinence intestinale/diarrhées nocturnes</p> <p>Voyage et mode d'alimentation récent</p> <p>Infection intestinale ou gastro-entérite récente</p> <p>Utilisation d'anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS)</p> <p>Tabagisme actif/passif</p> <p>Historique familial de maladie inflammatoire chronique intestinale</p> <p>Recherche de symptômes extra-intestinaux</p>
<u>Examen médical</u>	<p>Fréquence cardiaque, tension artérielle</p> <p>Poids, taille, indice de masse corporelle (IMC)</p> <p>Examen clinique complet</p> <p>Recherche de fistules péri-anales</p> <p>Toucher rectal</p>
<u>Laboratoire</u>	<p>Electrolytes, azote uréique sanguin, créatinine, NFS, VS</p> <p>Fonction hépatique, bilirubine</p> <p>Transferrine, ferritine, vitamines B12 et B9</p> <p>Bandelettes urinaires</p> <p>Inflammation : Protéine C-réactive, calprotectine fécale</p> <p>Coproculture (<i>Clostridium difficile</i>)</p>
<u>Endoscopie</u>	<p>Iléoscopie (inflammation, lésions, aspect de pavé, ulcères, fissures, sténoses, fistules)</p> <p>Oesophago-gastro-duodéno-scopie et biopsies quand les symptômes se manifestent dans la partie supérieure du tube digestif.</p> <p>Entéroscopie par vidéocapsule : si l'iléon terminal ne peut pas être intubé ou si les autres techniques d'imagerie se révèlent négatives</p>
<u>Histopathologie</u>	<p>Au moins deux biopsies sur 3 segments d'intestins dont l'iléon :</p> <p>Lésions muqueuses, inflammation, granulomes</p>
<u>Imagerie</u>	<p>IRM</p> <p>Tomodensitométrie à la recherche de fistules et d'abcès</p> <p>Scanner ou IRM à la recherche de manifestations extra-intestinales</p> <p>Cholangiopancréatographie en cas de suspicion de cholangite sclérosante.</p>
<u>Consultations spécialisées selon les atteintes</u>	<p>Chirurgie</p> <p>Rhumatologie</p> <p>Dermatologie</p> <p>Ophthalmologie</p> <p>Urologie</p> <p>Gynécologie (en cas de fistules rectovaginales)</p>

Annexes

Annexe 4 : Diagnostic différentiel entre tuberculose et maladie de Crohn (Casanova et Abel, 2009)

Caractéristiques	TB	CD
Cliniques	Antécédents de TB ou TB actuelle	Fistules
	Contact avec la TB	Abcès de la paroi intestinale
	Moins fréquemment fistules, abcès abdominaux, ou atteinte de la région péri-anale	Atteinte anale et périrectale
	RX thorax anormale (pas toujours)	Selles sanguinolentes
Endoscopiques	Ulcères superficiels irréguliers, transverses sans distribution segmentaire prédominante	Perforation intestinale
		Récidive après résection intestinale
	Pseudopolypes	Peut mimer les modifications rencontrées dans la TB
	Caecum > iléon	Caractéristiques moins fréquentes dans la TB intestinale (favorisant ainsi le diagnostic de MC) :
	Atteinte de la valve iléo-caecale (béance)	— Ulcération longitudinale
		— Aspect de pavé
	— Ulcération aphtoïde	
	— Iléon > caecum	
	— Valve iléo-caecale peut être sténosée ou ulcérée	

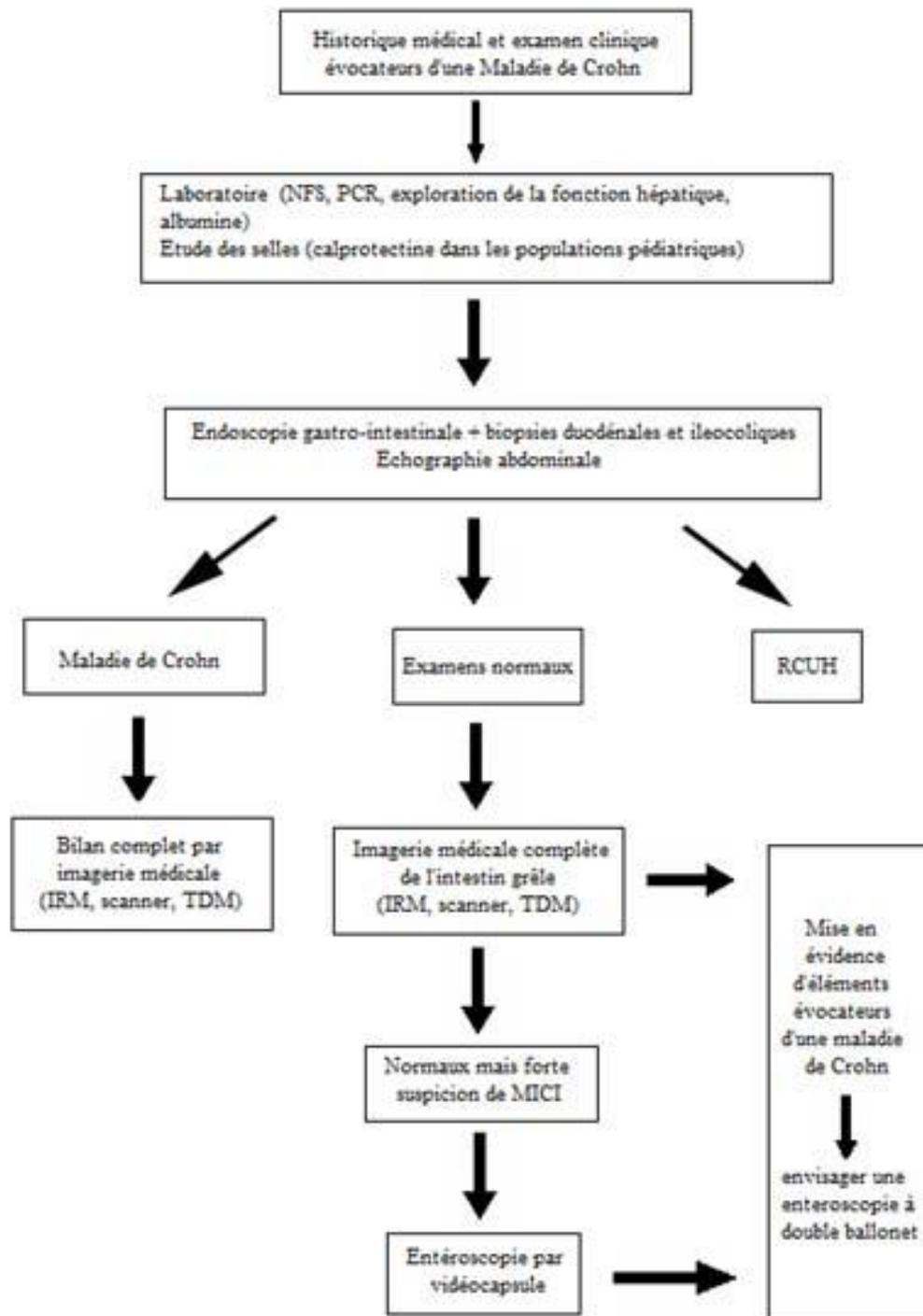
Annexes

Annexe 5 : Caractéristique permettant de faire la différence entre la RCH et la MC (Casanova et Abel, 2009)

	Caractéristiques typiques de la RCH	Caractéristiques typiques de la MC
Cliniques	Diarrhées fréquentes de petit volume, avec besoins impérieux En général, diarrhées sanglantes	Diarrhées accompagnées de douleurs abdominales et de malnutrition Stomatite Masse abdominale Lésions péri-anales
Endoscopiques et radiologiques	Inflammation colique superficielle diffuse Atteinte du rectum mais peut être inégale Erosions et ulcères superficiels Saignement spontané	Lésions asymétriques transmurales Principalement atteinte de l'iléon et du côlon droit Aspect pavimenteux Ulcères longitudinaux Fissures profondes
Histopathologiques	Inflammation diffuse de la muqueuse ou de la sous-	Inflammation granulomateuse
	Caractéristiques typiques de la RCH	Caractéristiques typiques de la MC
	muqueuse Déformation de l'architecture des cryptes	Fissures ou ulcères aphthoïdes présents ; inflammation transmurale fréquente
Marqueurs sérologiques	Anticorps anticytoplasme des polynucléaires	Anticorps anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Annexes

Annexe 6 : Algorithme de diagnostic d'une maladie de Crohn (Herfarth, 2013)



Annexes

Annexe 7 : Avantages et inconvénients de différentes méthodes non invasives d'Imagerie Médicale dans la maladie de Crohn (Herfarth, 2013)

	Avantages	Inconvénients
Radiographie (avec baryte)	<ul style="list-style-type: none">• Faible coût	<ul style="list-style-type: none">• Irradiation
Scanner	<ul style="list-style-type: none">• Bilan rapide et complet de l'état inflammatoire et des lésions	<ul style="list-style-type: none">• Pas d'informations sur la mobilité intestinale• Irradiation
IRM	<ul style="list-style-type: none">• Aucune irradiation• Détection des lésions inflammatoires actives	<ul style="list-style-type: none">• Pas d'information sur la mobilité intestinale (sauf si fluoroscopie associée)• Longue et coûteuse• Pas toujours disponible
Echographie	<ul style="list-style-type: none">• Aucune irradiation• Simple, rapide, peu coûteuse	<ul style="list-style-type: none">• Opérateur-dépendant• Absence de standardisation• Quantification de l'inflammation difficile

Annexes

Annexe 8 : Traitement d'entretien de la maladie de Crohn (Pierre-Lucas, 2012)

Présentation clinique et activité	Options thérapeutiques
Maladie légère-modérée	Sulfasalazine 2-4 g/j *
Maladie modérée-sévère	Azathioprine (2-2,5 mg/kg) ou 6-mercaptopurine (1-1,5 mg/kg) Alternatives : Méthotrexate 15 mg/sem s.c. + acide folique 5 mg/sem p.o. Infliximab 5 mg/kg i.v. toutes les 8 semaines ** Adalimumab 40 mg s.c. toutes les 2 semaines Certolizumab 400 mg s.c. toutes les 4 semaines
Maladie cortico-dépendante	Azathioprine (2-2,5 mg/kg) ou 6-mercaptopurine (1-1,5 mg/kg) Alternatives : Méthotrexate 15 mg/sem s.c. + acide folique 5 mg/sem p.o. Infliximab 5 mg/kg i.v. toutes les 8 semaines **

* En cas de maladie colique.
** Un schéma régulier de perfusion devrait être instauré pour prévenir l'apparition d'anticorps aux agents anti-TNF- α .

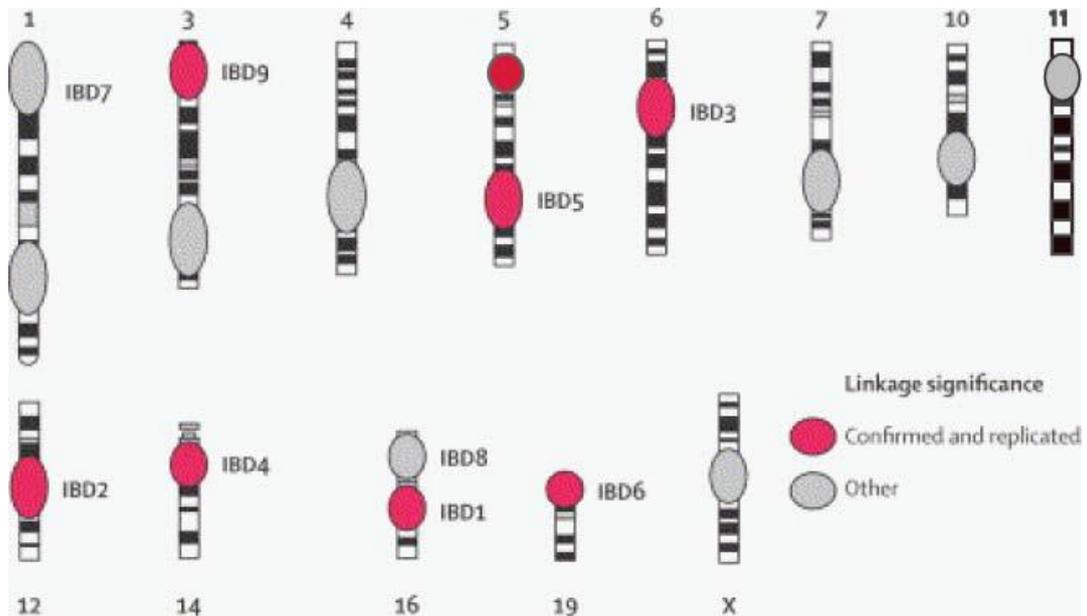
Annexes

Annexe 9 : Principaux agents infectieux incriminés dans la maladie de Crohn (Peyrin-Biroulet *et al.*, 2011)

<u>Agent infectieux</u>	<u>Argument positifs</u>	<u>Discussion</u>
Bactéries		
<i>Listeria monocytogenes</i> (Chen <i>et al.</i> , 2000)	*Infections à <i>L. monocytogenes</i> beaucoup plus fréquentes chez les patients atteints de MC	*Taux de détection après biopsie équivalent chez le malade et le sujet sain *Infections secondaires à un traitement par Infiximab
<i>Bactéries sulfato-réductrices</i> (Loubinoux <i>et al.</i> , 2002)	*Production d'hydrogène sulfuré, cytotoxique, pouvant conduire à une inflammation chronique * Prévalence de <i>Desulfovibrio piger</i> 4 fois plus importante lors de MICI	*Aucune corrélation entre présence de bactérie et intensité des crises *Commensal du tube digestif
<i>Mycoplasma</i> (Roediger et Macfarlane, 2002)	*Infections intracellulaires, chroniques avec inhibition du système immunitaire *Associés à des colites chez le chien	*Pas d'isolement chez les patients
<i>Yersinia enterocolitica</i> (Hugot <i>et al.</i> , 2003)	*Bactérie se développant jusqu'à -1°C *Lien temporel et géographique entre le développement de la maladie et l'utilisation de réfrigérateur *Bactérie présente dans les lésions de MC	*Eradication (Ciprofloxacine) sans effet sur la MC
<i>Mycobacterium avium paratuberculosis</i> (MAP) (Autschbach <i>et al.</i> , 2005) (Seksik, 2010)	*Présent dans le lait fermenté et l'eau non potable *Présent dans les zones ulcérées de l'intestin chez la moitié des malades	* Antibiothérapie inefficace *Pas d'infection sévère chez les patients sous Infiximab
<i>Adherent-invasive Escherichia coli</i> (AIEC) (Bringer <i>et al.</i> , 2006) (Meconi <i>et al.</i> , 2007)	*Présent chez 36,7% des patients dans les lésions de la muqueuse iléale de MC *Adhère à l'épithélium intestinal, présence dans les macrophages *Activité de la MC corrélée au nombre d' <i>E. Coli</i> dans l'iléon	*AIEC adhère préférentiellement à une muqueuse altérée par une MC *Activité pro-inflammatoire
<i>Chlamydia</i> (Müller <i>et al.</i> , 2006)	*Responsables d'arthrites auto-immunes	*Pas de détection chez les patients
<i>Helicobacter pylori</i> et autres Hélicobacters (Hansen <i>et al.</i> , 2010)	*Prévalence élevée dans les populations pédiatriques atteintes de MC *Responsable de colites chez l'animal (Cotton-top Tamarin)	*Aucune preuve d'une implication
Virus		
<i>Paramyxovirus</i> (rougeole) (Ghosh <i>et al.</i> , 2001)	*Infecte les cellules immunitaires *Lien entre vaccination et MC ?	*Absence d'ARN viral chez les patients *Pas de confirmation des données anciennes
<i>Cytomegalovirus (CMV)</i> (Yi <i>et al.</i> , 2013)	*Prévalence d'ADN et d'IgG anti-CMV plus élevée dans MC *Infection à CMV : sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6) effet immunosuppresseur	*Absence d'effet d'un traitement anti-CMV *Peut entretenir une réaction inflammatoire
Parasites		
<i>Helminthes</i> (Elliott <i>et al.</i> , 2000) (Hansen <i>et al.</i> , 2010)	*Prévalence de MC plus faible chez les sujets exposés aux helminthes *Infection par <i>S. mansoni</i> sur modèle murin : diminution de réaction Th1 et diminution des colites	*Effet protecteur des MICI dues aux propriétés immunorégulatrices *Diminution des infestations n'explique pas l'essor de la maladie

Annexes

Annexe 10 : Régions chromosomiques associées aux MICI identifiées par des études « génome entier » (Desreumaux *et al.*, 2002)



Annexes

Annexe 11 : Fiche de renseignements

Numéro du service :

Service :

Médecin traitant :

Données relatives au patient

Nom :

Prénom :

Sexe : Féminin Masculin

Age :ans

Etat civil : Marié Célibataire Enfants

Poids :Kg

Taille :

Tabac : Oui Non

Adresse :

Origine :

N° Tél :

Examens cliniques

1- Classification de Vienne :

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

- Localisation : L1 : iléal
L2 : colon
L3 : iléo colique
L4 : en amont du tiers distal de l'iléon

Annexes

- Intensité : B1 : non sténosant, non pénétrant
- B2 : sténosant
- B3 : pénétrant

2- Signes digestifs :

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

3- Sines généraux :

- Amaigrissement
- Fièvre
- Anémie
- Retard de croissance

4- Signes extra-digestifs :

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

Examens paracliniques

1- Biologiques :

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

2- Endoscopique :

.....
.....
.....

3- Histologiques :

.....
.....
.....

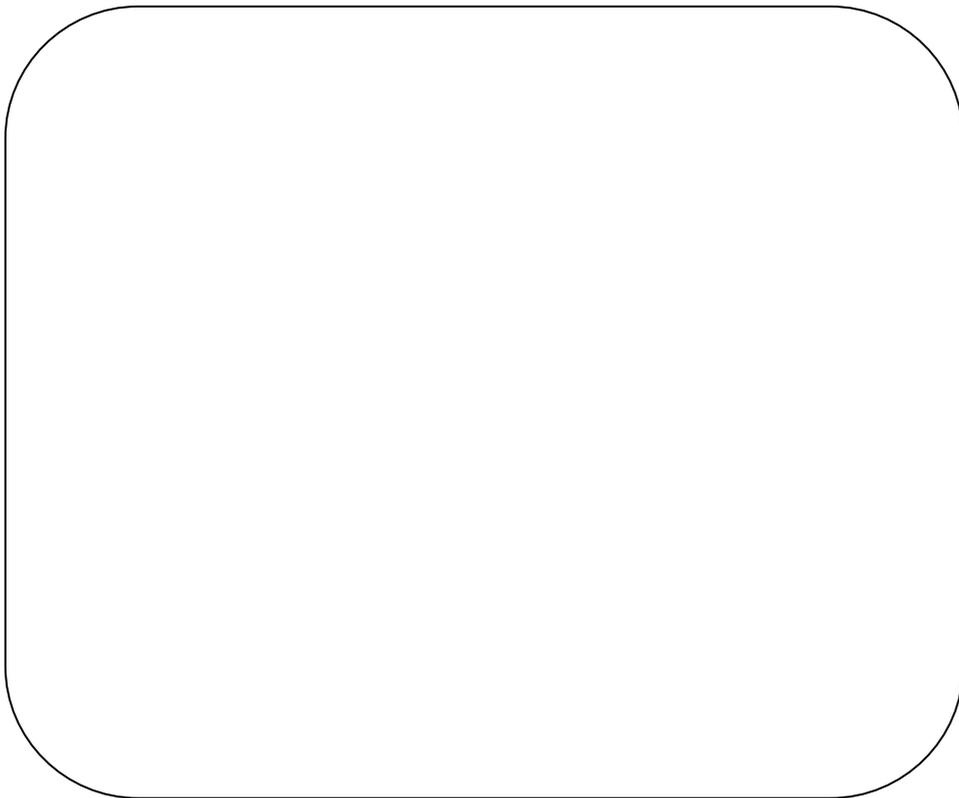
4- Radiologiques :

.....
.....
.....

Annexes

Terrain génétique

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



L'arbre généalogique

Observations :

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

Annexes

Annexe 12 : Fiche de consentement du patient

République Algérienne Démocratique et populaire

Centre Hospitalière Universitaire de Constantine

Service d'Hépto-gastro-entérologie

Fiche de consentement du patient

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

Je soussigné(e) :

Nom :

Prénom :

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

J'accepte ce type de recherche

Je m'oppose à ce type de recherche.

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

Oui

Non

Signature du patient

Signature du chercheur

Signature du médecin

Annexes

Annexe 13 : Technique d'extraction d'ADN

1. Préparation des leucocytes :

- Dans un tube Falcon de 50 ml, mettre le sang et compléter à 50 ml avec du TE 20:5, laisser 10 mn dans la glace
- Centrifuger 10 mn à 3900 rpm
- Jeter le surnageant
- Ajouter quelques ml de TE 20:5 au culot et le remettre en suspension
- Compléter à 25 ml avec du TE 20:5 et laisser 10 mn dans la glace
- Centrifuger dans les mêmes conditions
- Jeter le surnageant : obtention d'un culot leucocytaire

2. Extraction de l'ADN :

- Transvaser le culot des leucocytes dans un tube falcon de 15 ml
- Ajouter 3 ml de tampon de lyse en dilacérant le culot
- Ajouter 200 µl de SDS à 10%
- Ajouter 100 µl de protéinase K à 10 mg/ml
- Agiter le tube sur une roue à 27 °C une nuit
- Le lendemain, refroidir dans la glace
- Ajouter 1 ml de NaCl 4 M et agiter vigoureusement à la main remettre 5 mn dans la glace (précipitation des protéines)
- Centrifuger 15 mn à 2500 rpm
- Transvaser le surnageant dans un tube falcon de 50ml, ajouter deux fois son volume d'éthanol absolu préalablement refroidi (environ 8 ml) et agiter en retournant le tube plusieurs fois : la pelote d'ADN se forme
- Récupérer la pelote d'ADN avec une pipette pasteur et la rincer deux fois dans l'éthanol à 70%

Annexes

- Mettre la pelote dans un tube nunc de 1,5ml

3. Solubilisation :

- Ajouter entre 300 et 1000 µl d'eau bi distillée stérile selon la grosseur de la pelote.
- Laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C, puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jour).

- Préparation des solutions utilisées pour l'extraction d'ADN

1. TE 20 :5 : (Tris 20 mM, EDTA 5 mM, pH 7.5) auto clavé

- Tris : 2,422 g/l
- EDTA : 1,86 g/l
- Ajuster le pH avec HCL 1 N

2. Tampon de lyse :

- NaCl 400 mM
- EDTA 2 mM
- Tris 10 mM
- pH 8,2

Annexe 14 : Préparation du TBE 10X et 1X

1. TBE 10X

- Tris 108 g
- Acide borique 55 g
- Ajuster le PH à 8,3 avec l'acide acétique glacial
- EDTA 9.3 g
- QSP H2O pour 1L

2. TBE 1X : 100 ml de TBE 10X - 900 ml H2O



CARD15 Gene Polymorphisms in Algerian Patients with Crohn's Disease: Genotype-Phenotype Correlation

Daoui Z^{1,2}, Hammada T^{2,3}, Benlahcen B⁴, Abadi N², Satta D⁵

¹Department of Medicine, University Hadj Lakhder, Batna, Algeria.

²Biological and Molecular Genetic laboratory, Constantine 3 University, Algeria.

³Gastroenterology service Unit central Hospital, Constantine, Algeria.

⁴Internal medicine service Unit central Hospital, Batna, Algeria.

⁵Cellular and molecular Biological laboratory, Constantine 1 University, Algeria.

*Corresponding author's E-mail: zeineb.daoui@yahoo.fr

Accepted on: 15-10-2015; Finalized on: 31-12-2015.

ABSTRACT

Crohn's disease presents a complex multifactorial etiology with genetic and environmental factors contributing to the disorder. Three common polymorphisms of CARD15: R702W, G908R, and 1007fs are variably associated with Crohn's disease in different ethnic groups. We evaluated the frequencies of these three polymorphisms in patients with CD from East Algeria, and compared it with the healthy control population. A total of 103 patients with Crohn's disease and 144 healthy controls were included in this study. All of these individuals were genotyped for the three CARD15 polymorphisms cited above. Genotyping was performed by PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism). A genotype-phenotype correlation was performed. The control population exhibited frequencies of CARD15 polymorphisms similar to the results of previous studies, 0.35%, 3.5%, and 1.04% for the R702W, G908R, and 1007fs polymorphisms, respectively, whereas Crohn's disease patients had allele frequencies of 1.46%, 5.83%, and 4.85%, respectively. Moreover, in CD patients, R702W and 1007fs polymorphisms were significantly associated with different phenotypes compared to Crohn's disease wild-type patients. This genetic study provides evidence that the two variants alleles, R702W and 1007fs are associated with CD susceptibility in the Algerian population.

Keywords: CARD15; Crohn's disease; genotype-phenotype; Algerian population.

INTRODUCTION

Crohn's disease (CD) is a chronic idiopathic of inflammatory bowel disease (IBD) characterized by a granulomatous inflammation that affects the digestive tract from the mouth to the anus. It is also characterized as an autoimmune disease in which the body attacks itself and causes inflammation. This chronic inflammation of the gastrointestinal tract is caused by an abnormal immune reactivity to the bacterial flora of the intestine, which leads to the tissue damage seen in CD patients.¹

Epidemiological data shows that the incidence and prevalence of CD in northern Europe and North America have increased, and also has major social impact.^{2,3} The prevalence of CD in Algerian population is unknown but one study reports that the incidence of CD in the central region of East Algeria (Constantine) is 5.87/100 000 inhabitants.⁴

The etiopathogenesis of this disease is unknown but epidemiological data have provided evidence that it is a multifactorial disease caused by the interaction of genetic and environmental factors, which underlie disease development and progression.⁵

A number of linkage studies carried out in separate populations have confirmed the genetic linkage of CD to chromosome 16. In the same time Hugot⁶ and Ogura⁷ have independently unraveled the CD associated

nucleotide oligomerisation domain 2 (NOD2) gene, (also called CARD15: caspase activating recruitment domain 15), located on chromosome 16q12 within the area of strongest linkage to CD.

The CARD15 gene has 12 exons and encodes a protein of 1040 amino acids. The protein contains two N-terminal domains (CARDs), a central domain (NOD), and multiple C-terminal leucine-rich repeats (LRR).^{8,9}

CARD15 is an intracellular protein expressed in monocytes, macrophages and Paneth cells. It functions as a sensor for bacterial products, such as lipopolysaccharides (LPS), through the LRR domain. It has been hypothesized that the sensing of bacterial components would, under normal circumstances; result in the activation of nuclear factor-κB (NF-κB).¹⁰⁻¹²

CARD15 may be important for both initial defenses against commensal and pathogenic bacteria and tolerance mechanisms for maintaining controlled activation of the intestinal immune system. Significant progress has been made in defining NOD2 signaling partners and pathways and functional consequences of CARD15 mutations with respect to its activation, expression, signaling, synergistic effects with Toll-like receptor signaling, and antimicrobial effects.

However, CARD15 contributions to human intestinal inflammation are complex and incompletely understood.



Improved understanding of CARD15-mediated pathways may lead to identification of other molecules that can also contribute to the development of Crohn's disease in humans.^{13,14}

More than 60 sequence variants have been identified in the CARD15 gene, two are a single-base pair substitution (Arg702Trp: R702W and Gly908Arg:G908R) and one is frameshift alteration leading to a stop codon and truncation of CARD15 protein (Leu 1007fs insC:3020 insC). These variants affect the structure of LRR domain of the gene product or the adjacent region, with may be the site of binding of microbial pathogens.⁶

The presence of one variant allele increase the risk of developing CD form 1.5- to 4.3-fold, the presence of 2 copies increase the risk to 20- to 40-fold.¹⁵

CD patients with CARD15 mutations exhibit early onset of the disease, mainly ileal involvement and increase risk of fistulas and stenosis.^{11,16}

The accession numbers of these SNPs from the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) correspond to rs17860491, rs2066845, and rs5743293 (<http://www.ncbi.nlm.nih>).

In Algeria, until now no CD susceptibility locus has been reported in our population because no genome study has been done.

We decided, therefore, to perform a genetic screening and genotyping to determine whether CARD15 confers susceptibility to CD in East Algeria population.

The present study was undertaken to evaluate the frequency of three polymorphisms (R702W, G908R and 1007fs) of the CARD15 gene in Algerian patients with CD.

In addition, this study aimed to elucidate the importance of CARD15 polymorphisms in this cohort of CD patients and establish a genotype-phenotype correlation for CD.

MATERIALS AND METHODS

Study population

The study population was comprised of 103 patients with CD (45 males and 58 females) and 144 healthy (67 males and 77 females), unrelated controls. These patients were recruited from April 2011 to June 2014 in the gastroenterology service; Constantine, and internal medicine service, Batna, Algeria.

The diagnosis of CD was based on standard clinical, radiologic, endoscopic, and histologic criteria.¹⁷

The patients records were systematically reviewed for the following demographic and clinical characteristics: age, sex, smoking habits, age at diagnostic, disease localization (ileal, colonic, or ileocolonic), disease behavior (inflammatory, stricturing or fistulizing), presence of extaintestinal clinical manifestations (e.g., arthritis, uveitis, erythema nodosum), and familial IBD.¹⁰

All participating subjects gave written, informed consent before the genetic analyses.

Extraction and genotyping of the CARD15

Blood was collected in EDTA tubes by venipuncture from all participants. DNA from whole blood was extracted from peripheral blood leucocytes using standard salting-out procedures.

Each CARD15 mutation was assayed using initial amplification of the DNA sample by polymerase chain reaction (PCR) and subsequent analysis of the PCR products by reaction fragment length polymorphism (RFLP).

PCR conditions were initial denaturation at 94°C for 5mpn, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 30s, annealing at 61.8°C for 30s and elongation at 72°C for 30s and a final elongation step at 72°C for 7mpn. PCR products were resolved using 2% agarose gel electrophoresis to confirm specific amplification.

RFLP analysis was carried out as described by Helio.⁸ Briefly, fragments corresponding to R702W, G908R and 1007fs were digested with 1U of MspI, HhaI and ApaI (Fermentas), respectively, at 37°C for 16 hours. The digested products were resolved on 3% agarose gel and detected after Ethidium bromide staining.

PCR product size and digestion product size of the three polymorphisms are shown in Table1.

Statistical analysis

The association between a given genotype and phenotypic characteristics of CD was estimated by the odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI). The genotype frequencies observed in patients and controls were compared with Hardy-Weinberg expectations by using the χ^2 statistics. p-values <0.05% were considered to be significant.

Analysis was carried out using the Epi info 6 versions 6.04dfr – April 2001.

RESULTS

Patient population

In all, 103 patients were recruited in our study. The demographic characteristics and disease location according to the Vienna classification are depicted in Table 2.

The same contingency table was then used to consider each clinical feature (extraintestinal manifestation, familiarity and smoking).

The mean age (and standard deviation) of CD patients was 33.05±12.10 (rang: 15-67). There were more female than male patients in our sample of CD patients.

CARD15 Genotypes

The genotype and allele frequencies of the three common CARD15 variants (R702W, G908R, and 1007fs) in patients



and controls are shown in Table 3. They were all in Hardy-Weinberg equilibrium.

In our study, the association of R702W and 1007fs polymorphisms with CD was statically significant.

The frequencies of mutant's alleles were significantly higher in CD patients compared to controls. (R702W: 4.85% vs. 0.7%, $P < 0.05$; OR=7.30; 95% CI, 0.81- 167.61. 1007fs: 9.7% vs. 2.08%, $P < 0.05$, OR= 5.05; 95% CI, 1.24- 23.83).

Susceptibility allele frequency of the G908R polymorphism observed in CD patients was higher (11.65%) compared with (6.90%) in healthy controls. The results for this polymorphism did not reach statistical significance ($P > 0.05$, OR= 1.77; 95% CI, 0.68-4.64).

A total of 25.24% patients with CD carried a single copy of a CARD15 risk allele. At least one variant of risk was present in 9.72% of controls ($p = 0.001$, OR= 3.24, 95% CI = 1.47-6.77)

All individuals genotypes with each variant were either homozygotic for the normal allele or heterozygotic, and none homozygotic form for the mutated alleles had been detected.

Genotype-Phenotype Correlations

In the next step a detailed genotype/phenotype correlation was performed in our patients with CD. The percentages of CD patients carrying at least one CARD15 variant were correlated to demographic data, disease localization and behavior (Table 4).

In particular, the 1007fs risk allele was present in 9.70% patients and showed a significant positive association with younger age of onset (A1) ($P = 0.0026$). However, the sex of patients did not have any effect.

In increased frequency of stricturing form (15%) and ileocolon localization (18.60%) was positively related with 1007fs allele in the CARD15 gene ($P = 0.03$, $P = 0.022$, respectively).

Table 1: Primers, PCR product sizes, restriction enzymes and restriction digest product sizes for the three CARD15 mutations

Mutation	Forward and reverse primer sequences	PCR product size	Restriction enzyme	Digestion product size
R702W	5'TCA GCC TGA TGA CAT TTC3' 5'CGG GAT GGA GTG GAA GT3'	449bp	MspI	Wild type: 329, 66 and 54 bp Heterozygous: 329, 66, 54 and 120 bp Mutant:329 and 120 bp
G908R	5' CAC TGA CAC TGT CTG TTG ACT C 3' 5' AAG ACC TTC ATA AGT GGC CCC 3'	163bp	HhaI	Wild type: 163 bp Heterozygous: 27, 136 and 163 bp Mutant:27 and 136 bp
1007fs	5'CCT CAA AAT TCT GCC ATT CC3' 5'GGC AGA AGC CCT CTG CAG GGC G3'	151bp	ApaI	Wild type: 151 bp Heterozygous: 20, 131 and 151bp Mutant: 20 and 131 bp

Table 2: Clinical features of CD Patients

Clinical features	Total n (%)
Sex	
Male	45(43.7%)
Female	58(56.3%)
Smoking	
Never	42(40.78%)
Ever	61(59.22%)
Family history	29(28.1%)
Age at diagnostic (Mean±SD)	33.05 ±12.10
Age at onset	
<40 years (A1)	80(77.7%)
≥40 years (A2)	23(22.3%)
Disease behavior	
Nonstricturing, nonpenetrating (B1)	23(22.3%)
Stricturing (B2)	60(58.2%)
Penetrating (B3)	20(19.5%)
Location of the disease	
Terminal ileum (L1)	33(32.1%)
Colon (L2)	24(23.3%)
Ileocolon (L3)	43(41.7%)
Upper gastrointestinal tract (L4)	3(2.9%)
Extraintestinal clinical manifestations	43(41.7%)



Table 3: Genotype and allele frequencies of CARD15 in Algerians patients with Crohn's disease and healthy controls

Polymorphisms	Genotypes		Minor Allele frequency (%)		Percentage		†P-value	*Odds Ratio (95% CI)
	CD	Controls	CD	Controls	CD	Controls		
R702W								
WT/WT (C/C)	98	143						
WT/WM(C/T)	5	1	1.46	0.35	4.85	0.7	0.036	7.30
WM/WM(T/T)	0	0						
G908R								
WT/WT(G/G)	91	134						
WT/WM(G/C)	12	10	5.83	3.5	11.65	6.94	0.20	1.77
WM/WM(C/C)	0	0						
1007fs								
WT/WT	93	141						
WT/WM	10	3	4.85	1.04	9.71	2.08	0.008	5.05
WM/WM	0	0						

*Odds ratio for the minor allele; † P-value (chi-square test) for allele frequencies

Table 4: Genotype-Phenotype Correlations in CD Patients with susceptibility Alleles of the CARD15 Gene

Phenotype/genotype	R702W sus. Allele	G908R sus. Allele	1007fs sus. allele	One sus. Allele
N/Total (%)	5/103(4.85%)	12/103(11.6%)	10/103(9.70%)	27/103(26.21%)
Sex				
Male	2/45(4.44%)	4/45(8.9%)	6/45(13.33%)	12/45(26.66%)
Female	3/58(5.17%)	8/58(13.8%)	4/58(6.9%)	15/58(25.86%)
Smoking				
Never	2/42(4.76%)	<u>1/42(2.4%)</u>	<u>1/42(2.4%)</u>	<u>4/42(9.52%)</u>
Ever	3/61(4.92%)	11/61(18.03%)	<u>9/61(14.75%)</u>	22/61(36.06%)
Family history	1/29 (3.45%)	1/29(3.45%)	2/29(6.9%)	4/29(13.8%)
Age at onset				
<40 years (A1)	3/80(3.75%)	10/80(12.5%)	<u>4/80(5%)</u>	17/80(21.25%)
≥40 years (A2)	2/23(8.62%)	2/23(8.7%)	6/23(2%)	10/23(34.48%)
Disease behavior				
Non stricturing, nonpenetrating (B1)	1/23(4.35%)	2/23(8.7%)	1/23(4.35%)	4/23(17.1%)
Stricturing (B2)	4/60(6.66%)	7/60(11.6%)	<u>9/60(15%)</u>	20/60(33.33%)
Penetrating (B3)	0/20(0%)	3/20(15%)	0/20(0%)	3/20(15%)
Location of the disease				
Terminal ileum (L1)	0/33(0%)	3/33(9%)	0/33(0%)	3/33(9.09%)
Colon (L2)	1/24(4.16%)	3/24(12.5%)	1/24(4.16%)	5/24(20.83%)
Ileocolon (L3)	4/43(9.30%)	6/43(14%)	<u>8/43(18.60%)</u>	<u>18/43(41.86%)</u>
Upper gastrointestinal tract (L4)	0/3 (0%)	0/3(0%)	1/3(33.33%)	1/3(33.33%)
Extraintestinal clinical manifestations	2/43(4.6%)	4/43(9.3%)	<u>1/43(2.32%)</u>	<u>7/43(16.27%)</u>

*Susceptibility allele; *Statistically significant positive associations are underlined; † Statistically significant negative associations are indicated



Table 5: Comparison of allele frequencies of CARD15 susceptibility variants from different populations

Population [reference]	Cohort P/C	Allele frequencies (%)			
		R702W	G908R	1007fs	
Spanish [16]	183/172	Patients	7.6	3.0	4.6
		Controls	3.4	1.1	2.0
Brazilian [11]	187/255	Patients	9.63	1.93	3.48
		Controls	2.75	1.64	0.78
Italy [38]	133/103	Patients	9.8	4.5	9.8
		Controls	2.4	4.3	2.9
Iranian [37]	40/100	Patients	16.25	5	2.5
		Controls	1	1	1
Greece [18]	364/539	Patients	9.1	10	/
		Controls	5.47	6.77	/
Indian [29]	82/149	Patients	0	0	0
		Controls	0	0	0
Turkish [46]	56/100	Patients	0.9	8	1.8
		Controls	0.5	0	1
Saudian [36]	46/50	Patients	5.22	4.22	4.56
		Controls	3.4	3.2	4
African American [34]	124/601	Patients	1.7	0	/
		Controls	5.4	1.5	/
Tunisian [5]	130/90	Patients	1.9	4.9	1
		Controls	0.5	2.7	0
Morocco [27]	101/100	Patients	0.49	6.43	0.99
		Controls	0.46	2.80	0.00
Present study	103/144	Patients	1.46	5.83	4.85
		Controls	0.35	3.5	1.04

By univariate analysis, the presence of one risk allele was significantly associated with ileocolon form ($p=0.006$) and Terminal ileum (0.002).

Interestingly, the smoking, an environmental factor involved in the modulation of the phenotype was directly associated with CD patients (1007fs: $p=0.03$, G908R: $p=0.014$, and one variant of risk: $p=0.001$).

In CD, the estimated chance of finding at least one variant, and the 1007fs susceptibility allele was significantly increased among patients with the extra-intestinal clinical manifestation ($P=0.025$, $P=0.032$, respectively).

After adjusting, none of three variants of CARD15 gene alone was significantly associated with sex and family history.

DISCUSSION

Since 2001, several independent studies of different ethnic and racial groups have demonstrated that the CARD15 gene variants contribute to a significant extent to the risk of CD.

In the present study, we report the first analysis of genetic susceptibility to CD in East Algerian population (Constantine and Batna).

In our CD patients, we observed significantly higher frequencies than in the control population. Moreover, as expected, no individuals with two susceptibility variants



were found in our cohort, as most other studies have reported.¹⁶⁻¹⁸

Several studies were carried out to investigate the role of the CARD15 gene in CD susceptibility in different population. The three polymorphisms of CARD15 gene displayed the strongest association in European,^{6-8,19-21} American,^{10,22} Australian²³ and Arabic population.²⁴ Nevertheless, some studies have reported a variable association of CARD15 with CD. No disease association with CARD15 variants was documented in Asia and Africa patients.^{5,25-28} These results confirm the complexity of the origin of CD and provide evidence for the genetic variability of the CARD15 gene in different populations.

Conversely, there was a lack of mutant variants in the Asian populations of India,²⁹ China,^{30,31} Korea³² and Malaysia.³³

The R702W frequency observed in our Algerian CD patients (1.46%) is consistent with those generally reported in tunisian and african-american cohorts.^{5,34}

In the present study the frameshift mutation 1007fs showed a decreased allele frequency (4.85%), compared with the range of 6%-16% in the majority of study populations in Europe and America.^{6,7,33} In addition, studies from Spain,¹⁶ Brazilian,¹¹ and Saudian population have also reported similar low allele frequencies for 1007fs.³⁶

The frequency of G908R is higher in CD patients (5.83%) compared to controls (3.5%), but no significant association with CD was established.

These results were in agreement with some European,⁸ Iranian,³⁷ Tunisian,⁵ and Moroccan studies,²⁷ where no significant association was observed. G908R mutant allele frequency in CD patients covered a wide range regarding different ethnic groups (0.6%-14.2%).³⁷

Regarding the different results in allele frequencies between the studies, can be explained by larger regional and ethnic differences in genotypes, and the relatively small numbers of cases included in most studies (Table 5).

Moreover, in our study, the risk of developing CD with a more aggressive course was increased in compound heterozygotes. In other population, stronger associations have been reported for homozygotes.³⁸

Some studies have suggested that familial and sporadic CD, are two distinct entities because of the differences in disease localization and behavior between the two groups³⁹. Our patients were constituted only of sporadic cases, no familial cases were found. European and American studies have revealed that the familial as well as the sporadic cases were used to show the association between CARD15 and CD.^{6,7,10,19,20}

We found that different risk alleles might be associated with different clinical features; in particular, the 1007fs allele seems to be associated with age of onset <40 years. We observed a significant association in patients with one

susceptibility allele toward a younger age of onset; this association was replicated^{21,35,40} in Spanish, North American and Italian population. However, in previous studies of the Mediterranean population, there is substantial heterogeneity between populations, and⁴¹ no association was noted in one Spanish cohort. This a priori contradiction could be explained by the different demographic features of this region.

The 1007fs allele seems to correlate with ileocolan localization and stricturing form. These data suggest a more aggressive course of the disease in carriers of risk alleles. These patients with one variant were also found to show an association with (simply remove : the structuring form and) ileocolan localization, as was also reported by Lesage,²⁰ De Diego¹⁶ and Bhullar.²³

The strongest observed effect for ileal location is consistent with the proposed involvement of ileal Paneth cells in the pathophysiology of NOD/CARD15-mediated disease susceptibility.³⁸

NOD/CARD15 mutations may, thus, abrogate normal Paneth cell behavior,⁴² explaining preferential involvement of the terminal ileum.

Tobacco factor is associated with the CD specifically with G908R and 1007fs. These results are consistent with studies which were carried out on the Spanish⁶, French¹⁶ and Italian population.³⁸

The analysis of genotype-phenotype correlations revealed an increased chance of mutation positivity (1007fs) in CD patients and extraintestinal manifestations,^{3,43} in agreement with most previous studies,^{16,23,40} and disagreement with other studies.

These contrasting results can be ascribed to the different ethnic background of the various CD populations studied.

CONCLUSION

Our study is the first to determine the prevalence of CARD15 gene mutations and correlation genotype-phenotype in east Algerian patients with disease.

This genetic study provides evidence that the two major CARD15 variant (R702W, 1007fs) alleles are associated with Crohn's disease susceptibility in Algeria; however, there is no evidence that the G908R polymorphism has any association.

Moreover, our data confirm a correlation between genotype (1007fs) and phenotype (younger age of onset, ileocolan localization and stricturing form). Indeed, an eventual goal in the genomic study of Crohn's disease is to identify this association and to apply them to clinical practice.

Finally, the presented data suggest a need for further work and larger studies to determine other genes (TLR4, IL23R, R381Q, STAT3, IRGM, eQTLs, P268S, JW1 and N852S) and environmental factors influencing Crohn's disease and behavior in the Algerian population.^{44,45}



Acknowledgement: The authors thank all patients who have been involved in this evaluation. We thank also Dr Chellat Djalila, Sedrati Khadija and Semmam Warda for their help.

REFERENCES

- Rogler G, The effects of NOD2/CARD15 mutations on the function of the intestinal barrier. *Journal of Crohn's and Colitis*, 1, 2007, 53-60.
- Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, Ollendorf D, Bousvaros A, Grand RJ, Finkelstein JA, The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States, *Clin Gastroenterol Hepatol*, 5, 2007, 1424-1429.
- Burisch J, Munkholm P, Inflammatory bowel disease epidemiology, *Curr Opin Gastroenterol*, 29, 2013, 357-362.
- Hammada T, Lemdaoui C, Boutra F, Zoughailech D, Asselah H, Epidemiological aspect of inflammatory bowel disease in a Algerian population, *J Afr Hépatol Gastroentérol*, 5, 2011, 293-302.
- Zouiten-Mekki L, Zaouali H, boubaker J, Karaoui S, Fekih M, Matri S, Hamzaoui S, Filali A, Chaabouni H, Hugot JP, CARD15/NOD2 in a Tunisian population with Crohn's disease. *Dig Dis Sci*, 50, 2005, 130-135.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Bindert V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M and Thomas G, Association of CARD15 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease, *Nature*, 411, 2001, 599-603.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohra N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kischner BS, Hanauer SB, Nunez G and Cho JH, A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease, *Nature*, 411, 2001, 603-606.
- Helio T, Halme L, Lappalainen M, Fodstad H, Paavola-Sakki P, Turunen U, Färkkilä M, Krusius T and Kontula K, CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease, *Gut*, 52, 2003, 558–562.
- King K, Sheikh MF, Cuthbert AP, Fisher S, Onnie CM, Mirza M, Pattni RC, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Lewis CM, Roberts RG and Mathew CG, Mutation, selection, and evolution of the Crohn's disease susceptibility gene CARD15, *Human Mutation*, 27, 2006, 44-54.
- Vermeire S, Wild G, Kocher K, Kocher K, Cousineau J, Dufresne L, Alain Bitton, Langelier D, Pare P, Lapointe G, Cohen A, Daly MJ and Rioux JD, CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure, *Am J Hum Genet*, 71, 2002, 74-83.
- Baptista ML, Amarante H, Picheth G, Sdepanian LV, Peterson N, Babasukumar U, Lima HC and Kugathasan S, CARD15 and IL23R influences Crohn's Disease susceptibility but not disease phenotype in a Brazilian population, *Inflamm. Bowel. Dis*, 14, 2008, 674-679.
- Maev IV, Andreev DN, Role of Mutations in NOD2/CARD15, ATG16L1, and IRGM in the Pathogenesis of Crohn's Disease, *Inter J Bio Medicin*, 4, 2014, 7-10.
- Brand S, Konrad A, Crispin A, Göke B, Lohse P and Ochsenkühn T, The role of toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and CARD15/NOD2 Mutations in the susceptibility and phenotype of Crohn's disease, *Inflamm Bowel Dis*, 11, 2005, 645-652.
- Abraham C, Cho JH, Functional Consequences of NOD2 (CARD15) Mutations, *Inflamm Bowel Dis*, 12, 2006, 641-650.
- Niess JH, Klaus J, Stephani J, Pflüger C, Degenkolb N, Spaniol U, Mayer B, Lahr G and von Boyen GBT, NOD2 Polymorphism Predicts Response to Treatment in Crohn's Disease—First Steps to a Personalized Therapy, *Dig Dis Sci*, 57, 2012, 879–886.
- De Diego C, Alcantara M, Valle J, Pérez-grueso MJ, Muñoz-Rosas C, Carrobbles JM and Martínez-Castro P, Frequency of CARD15 polymorphisms in patients with Crohn's disease from Toledo, Spain: Genotype-Phenotype Correlation, *Genetic Testing*, 10, 2006, 178-85.
- Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, Tassies D, Plaza S, Delgado S, Lacy AM, Pique JM, Yagüe J and Panés J, Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence, *Ann Surg*, 242, 2005, 693–700.
- Gazouli M, Pachoula L, Panayotou L, Mantzaris G, Chrousos G, Anagnou NP and Roma-Giannikou E, NOD2/CARD15, ATG16L1 and IL23R gene polymorphisms and childhood-onset of Crohn's disease, *World J Gastroenterol*, 16, 2010, 1753-1758.
- Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher P JP, Mascheretti S, Jahnsen J, Moum B, Klump B, Krawczak M, Mirza MM, Foelsch UR, Vatn M and Schreiber S, Association of NOD2 (CARD15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study, *Lancet*, 359, 2002, 1661-1665.
- Lesage S, Zouali H, Cézard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M and Jannot AS, CARD15/NOD2 Mutational Analysis and Genotype-Phenotype Correlation in 612 Patients with Inflammatory Bowel Disease, *Am J Hum Genet*, 70, 2002, 845-857.
- Nunez C, Barreiro M, Dominguez-Munoz JE, Lorenzo A, Zapata C and Pena S, CARD15 mutations in patients with Crohn's disease in a homogeneous Spanish population, *Am J Gastroenterol*, 99, 2004, 450-456.
- Alvarez-Lobos M, Pizarro DP, Palavecino CE, Espinoza A, Sebastián VP, Alvarado JC, Ibañez P, Quintana C, Díaz O, Kalergis AM and Bueno SM, Role of Salmonella enterica exposure in Chilean Crohn's disease patients, *World J Gastroenterol*, 19, 2013, 5855-5862.
- Bhullar M, Macrae F, Brown G, Smith M, Sharpe K, Prediction of Crohn's disease aggression through NOD2/CARD15 gene sequencing in an Australian cohort, *World J Gastroenterol*, 20, 2014, 5008-5016.
- Al-Sulaiman R, Ismail M, Yasawy M, Al-Ateeq S, Abdelrashid M, Hussameddin AM, Al-Nafie A, Al-Ali AK, Akhtar MS and Al-Quorain AA, Association of NOD2/CARD15, DLG5, OCTN1 and Toll-like Receptor 4 Gene Polymorphisms with Inflammatory Bowel Disease: A University Hospital Experience, *Saudi Journal of Medicine & Medical Sciences*, 2, 2014, 81-85.
- Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Kazumori T, Nakamura Y, Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease, *J Hum Genet*, 47, 2002, 469-472.
- Ouyang Q, Tandon R, Goh K, Ooi CJ, Ogata H and Focchi C, The emergence of inflammatory bowel disease in the Asian Pacific region, *Current Opinion in Gastroenterology*, 21, 2005, 408-413.



27. Hama I, Ratbi I, Reggoug S, Elkerch F, Kharrasse G, Errabihi, Ouazzani H and Sefiani A, Non-association of Crohn's disease with NOD2 gene variants in Moroccan patients, *Gene*, 4994, 2014, 121-123.
28. Cavanaugh J, NOD2: Ethnic and geographic differences, *World J Gastroenterol*, 12, 2006, 3673-3677.
29. Pugazhendhi S, Amet A, Balamurugan R, Subramanian V and Ramakrishna B, Common NOD2 mutations are absent in patients with Crohn's disease in India, *Indian J Gastroenterol*, 27, 2008, 201-203.
30. Leong WL, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP and Sung JYI, NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population, *Aliment Pharmacol Ther*, 17, 2003, 1465-1470.
31. Li M, Gao X, Guo CC, Wu KC, Zhang X and Hu PJ, OCTN and CARD15 gene polymorphism in Chinese patients with inflammatory bowel disease, *World J Gastroenterol*, 14, 2008, 4923-4927.
32. Croucher PJ, Mascheretti S, Hampe J, Huse K, Frenzel H, Stoll M, Lu T, Nikolaus S, Yang SK, Krawczak M, Kim WH and Schreiber S, Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutations in two ethnically divergent populations, *Eur J Hum Genet*, 11, 2003, 6-16.
33. Chua KH, Ng CC, Hilmi I, Goh KL, Co-inheritance of variants/mutations in Malaysian patients with Crohn's disease, *Genet Mol Res*, 11, 2012, 3115-3121.
34. Kugathasan S, Loizides A, Babusukumar U, McGuire E, Wang T, Hooper P, Nebel J, Koftman G, Noel R, Broeckel U and Tolia V, Comparative phenotypic and CARD15 mutational Analysis among African American, Hispanic, and White children with Crohn's disease, *Inflamm Bowel Dis*, 11, 2005, 631-638.
35. Ananthakrishnan AN, Huang H, Nguyen DD, Sauk J, Yajnik V and Xavier RJ, Differential Effect of Genetic Burden on Disease Phenotypes in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: Analysis of a North American Cohort, *Am J Gastroenterol*, 109, 2014, 395-400.
36. Azzam N, Nounou H, Alharbi O, Aljebreen A and Shalaby M, CARD15/NOD2, CD14 and Toll-Like 4 receptor gene polymorphisms in Saudi patients with Crohn's disease, *In J Mol Sci*, 13, 2012, 4268-4280.
37. Derakhshan F, Naderi N, Farnood A, Firouzi F, Hbibbi M, Rezvany MR, Javeri A, Bahari A, Balaii H, Ghaffarzadeh MR, Aghazadeh R and Zali MR, Frequency of three common mutations of CARD15/NOD2 gene in Iranian IBD patients, *Indian J Gastroenterol*, 27, 2008, 8-11.
38. Rigoli L, Romano C, Caruso RA, Lo Presti M A, Bella CD, Procopio V, Giudice GL, Amorini M, Costantino G, Sergi MD, Cuppari C, Calabro GE, Gallizi R, Salpietro CD and Fries W, Clinical significance of NOD2/CARD15 and Toll-like receptor 4 gene single nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease, *World Gastroenterol*, 14, 2008, 4454-4461.
39. Barmada MM, Brant SR, Nicolae DL, Achkar JP, Panhuysen C, Bayless T, Cho J and Duerr RH, A genome scan in 260 inflammatory bowel disease-affected relative pairs, *Inflamm Bowel Dis*, 10, 2004, 15-22.
40. Giachino D, Duist MM, Regazzoni S, Gregori D, Bardessono M, Salacone P, Scaglione N, Sostegni R, Sapone N, Bresso F, Sambataro A, Gaia E, Pera A, Astegiano M and Marchi MD, Analysis of the CARD15 variants R702W, G908R and L1007fs in Italian IBD patients, *European Journal of Human Genetics*, 12, 2004, 206-212.
41. Mendoza JL, Murillo LS, Fernández L, Peña AS, Lana R, Urcelay E, Cruz-Santamaría DM, Concha EG, Díaz-Rubio M and García-Paredes J, Prevalence of mutations of the NOD2/CARD15 gene and relation to phenotype in Spanish patients with Crohn disease, *Scand J Gastroenterol*, 38, 2003, 1235-1240.
42. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, Crawshaw J, Large O, De Silva A, Cook JT, Cullen S, Welsh KI and Jewell DP, The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease, *Gastroenterology*, 122, 2002, 854-866.
43. Bunning C, Genschel J, Buhner S, Kruger S, Kling K, Dignass A, Baier P, Bochow B, Ockenga J, Schmidt HJ and Lochs H, Mutation in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal restriction and are a risk factor for reoperation, *Aliment pharmacol ther*, 19, 2004, 1073-1078.
44. Liu J, Anderson C, Genetic studies of Crohn's disease: Past, present and future, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 28, 2014, 373-386.
45. Long WY, Chen L, Zhang CL, Nong RM, Lin MJ, Zhan LL and Lv XP, Association between NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in Chinese Zhuang patients, *World J Gastroenterol*, 20, 2014, 4737-4744.
46. Uyar FA, Over-Hamzaolgu H, Ture F, Gul A, Tözün N, Saruhan-Direskeneli G, Distribution of common CARD15 variants in patients with sporadic Crohn's disease case from Turkey, *Digestive Disease and Sciences*, 51, 2006, 706-710.

Source of Support: Nil, Conflict of Interest: None.





4^{èmes} Journées Auressiennes de Médecine

Pathologies génétiques constitutionnelles ou acquises : réalités et perspectives

Batna, 30-31 octobre 2014

Génétique et prévention du cancer médullaire de la thyroïde

Chikouche Ammar (1, 2), Aït Abdelkader Belaid (2), Kassoul Asma (2), Talbi Abir (2), Aït Abdallah Malika (2), Sbahi Kahina (2), Boumaza Hakima (2), Oukrine Fériel (2), Zeraoulia Nazih (2), Aouaitia Mérim (2), Boudissa Mebarek (3), Semrouni Mourad (3), Fodil Dalila (3), Rezoug Malika (4), Ahmed Ali Leila (4), Chentli Farida (4), Feddala Saïda (5), Meskine Djamil (5) et Griene Lakhdar (1, 2).

(1) Laboratoire d'Endocrinologie, Centre Pierre et Marie Curie - Alger. (2) Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, Université d'Alger 1. (3) Service d'Endocrinologie, Centre Pierre et Marie Curie - Alger. (4) Service d'Endocrinologie, CHU Bab El Oued, Alger, Algérie. (5) Service d'Endocrinologie, EHS Bologhine, Alger, Algérie.

Introduction : Le cancer médullaire de la thyroïde ou CMT se présente sous forme sporadique dans 75% des cas et sous forme familiale dans 25% des cas, entrant alors dans le cadre des Néoplasies Endocriniennes Multiples de type 2 (NEM2) qui se présentent sous 3 formes cliniques : NEM2A, NEM2B et FMTC ou CMT familial isolé. Ces NEM2 sont des affections héréditaires rares, transmises selon le mode autosomique dominant, avec pénétrance complète, liées à des mutations du proto-oncogène RET. Le diagnostic génotypique permet de mettre en évidence une mutation au niveau de certaines régions codantes du gène RET, ce qui va permettre de poser le diagnostic de NEM2. Le dépistage génétique des apparentés du cas index, permettra la mise en place d'une prise en charge adéquate des porteurs de la mutation. **Patients et Méthodes :** Les patients étudiés nous ont été adressés, avec le diagnostic de CMT isolés, de NEM2A et de NEM2B. Des apparentés, appartenant à des familles de cas index, ont bénéficié de cette étude. L'extraction d'ADN a été faite par la méthode par les sels. Une amplification des exons d'intérêt (8, 10, 11, 13, 14, 15 et 16) a été faite par PCR et le séquençage a été réalisé sur ABI 3130 Applied Biosystems. **Résultats :** Chez les patients avec CMT isolés, certains étaient porteurs de mutations classiques du gène RET. Les patients NEM2B et certains patients NEM2A, étaient porteurs de mutations décrites dans la littérature. L'analyse génétique des apparentés, a retrouvé des porteurs de la mutation familiale. **Conclusion :** Les différentes mutations retrouvées dans notre série de patients sont connues et répertoriées dans la littérature, sauf une. Des apparentés cliniquement sains mais porteurs de la mutation, ont bénéficiés d'une thyroïdectomie prophylactique.

Consanguinité et affections psychiatriques en Algérie.

Aïcha Dahdouh Guermouche (1), Boualem Semaoune (2)

(1) Service de psychiatrie. CHU D'Oran (2) Service de psychiatrie. HCA d'Alger

Plusieurs courants d'études soulignent les conséquences de la consanguinité sur la santé de la population. La génétique des populations reconnaît actuellement, en plus de l'augmentation des taux de morbi-mortalité infantile et des maladies récessives monogéniques, l'implication de la consanguinité dans l'apparition des maladies communes multifactorielles comme le diabète, l'hypertension artérielle et les troubles mentaux au sein des populations génétiquement homogènes ou endogames et plus particulièrement depuis l'incrimination de l'hypothèse « maladie commune - variants rares » dans la l'étiopathogénie des maladies communes. Par ailleurs, les études d'épidémiologie génétique réalisées dans certains pays pratiquant la consanguinité suggèrent l'existence d'un lien entre consanguinité et augmentation de la prévalence de la schizophrénie et des troubles bipolaires chez les descendants de couples consanguins. Enfin, ces dernières années, les techniques spécifiques de recherche d'homozygotie (ROH), la recherche de CNVs et de séquençage complet du génome (WES) chez des familles consanguines, ont permis d'étayer ces thèses en mettant

en évidence des variants génétiques rares significativement associés aux troubles mentaux majeurs comme la schizophrénie, les troubles bipolaires et l'autisme. A ce titre, nous avons réalisé une étude familiale de recherche de variants génétiques des troubles psychotiques au pré de quatre familles consanguines identifiées dans la région de Tlemcen en Algérie. La puce Agilent Human Genome CGH Microarray Kit 44K, a été utilisée pour l'analyse des quatre familles, portant sur 45 sujets dont 20 malades, ainsi que chez une population contrôle de 55 individus qui ont été analysés à l'unité de génétique psychiatrique des hôpitaux universitaires de Genève. Les résultats de cette étude permettent de souligner l'intérêt de la mise en place de consultations spécialisées de conseil génétique pour ces populations dans le cadre d'une politique de prévention et de sensibilisation sur les risques liés aux unions consanguines.

Identification de nouvelles mutations causant les surdités congénitales dans les familles algériennes

Fatima Ammar-khodja(1), M. Dahmani(1), H. Ibrahim(2), S. Ouheh(3), C. Bonnet(4)

(1) Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences Biologiques, USTHB Alger. (2) Service d'Otorhinolaryngologie (ORL), CHU Mustapha Bacha, Alger. (3) Service d'Otorhinolaryngologie (ORL), CHU de Kouba, Alger. (4) Unité de génétique et de physiologie de l'audition. Institut Pasteur de Paris, France.

La PCR-RFLP et le séquençage de différents gènes montrent que si certains gènes (GJB6, ESRRB, LRTOMT, MTRNR de l'ADN mitochondrial) ne sont pas impliqués dans la surdité congénitale, les mutations du gène GJB2 (DFNB1) codant la connexine 26 touchent 30% de la population algérienne dont la majorité est atteinte de surdité profonde. Outre la mutation majoritaire «35delG» du gène GJB2, des mutations de nombreux gènes à fréquence variable sont responsables de surdité congénitale. Le gène *TMCI* : transmembrane channel-like gene 1 (locus DFNB7/B11) (9q13-q21) présente une mutation majoritaire au Maghreb R34* au niveau de l'exon 3. La même mutation au niveau de l'exon 7 est également retrouvée en Algérie. Le gène *OTOF* (DFNB9) (2p22-23) code l'Otoferline, membre de la famille des ferlines. Si la mutation majoritaire en Espagne: c.2485C>T (p.Gln829stop) est absente en Algérie, 3 mutations différentes sont mises en évidence: (E54*) (exon 1). (c.709C> T: p.Arg237*(exon 7) et c.2122C> T p.Arg708*(exon 18). Le gène *SLC26A4* (DFNB4) (7q31) code la pendrine. Les mutations de ce gène sont responsables de la surdité non syndromique due à la malformation de l'oreille interne avec élargissement de l'aqueduc vestibulaire (EVA) et du syndrome Pendred (PS) (surdité et goitre). Les mutations rencontrées sont p.Leu 345* de l'exon 9 et (c.1334T>G :p.Leu445Trp) de l'exon 11 avec EVA.

B thalassémie majeure: traitement et complications – à propos de 21 cas

N. Chergui, B. Djeradi, F. Nacer, T. Zemali, H. Merzougui, A. Meraoumia, A. Salmi, F. Khelif.

Centre de wilaya de transfusion sanguine, EPH Alia Salah Tébéssa.

Introduction : Les hémoglobinopathies sont des maladies héréditaires de l'hémoglobine se caractérisent par un début précoce dans la vie, fréquentes dans le pourtour méditerranéen, la thalassémie et la drépanocytose sont les plus fréquemment rencontrées dans la région de Tébéssa. Afin d'assurer une meilleure prise en charge pour ces patients une organisation transfusionnelle rigoureuse est nécessaire entre le centre de transfusion sanguine et les services de soin. Cette prise en charge permet de garantir aux polytransfusés un rythme transfusionnel régulier, d'éviter les

accidents post transfusionnels et de prévenir la survenue des allo-immunisations. **Objectifs** : Présenter notre expérience de prise en charge des hémoglobinopathes et les problèmes rencontrés ainsi que la fréquence dans notre région. **Matériel et méthodes** : Nous avons recensé 46 hémoglobinopathes (thalassémiques et drépanocytaires) admis au niveau des services d'hématologie et de pédiatrie (l'EHS Khaldi Azouz et les EPH BouguerraBoulares, Cheriaa, Bir El ater, Ouenza, Alia Salah et Morsot wilaya de Tébessa). Ces patients ont bénéficié depuis juin 2012 de concentré de globules rouges phénotypés, déleucocytés, et compatibilisés. Le diagnostic a été confirmé par consultation des dossiers des malades (FNS, électrophorèse d'Hb et autres tests), réalisation d'une électrophorèse d'Hb pour les cas douteux. **Résultats et discussion** : Les 46 malades représentent une fréquence de 0,007 %, cette fréquence n'inclue pas la totalité des malades car certains patients se transfusent encore dans d'autres wilayas. Les B thalassémiques sont les majoritaires soit 87% des malades répartis dans toute la wilaya, les drépanocytaires représentent 8,7 % et 4,3 % présentent une hémoglobinose S/C, un patient présente une anémie hémolytique auto immunitaire associée à une sphérocytose héréditaire. Au centre de transfusion sanguine nous avons fait la prise en charge transfusionnelle de 21 patients β thalassémiques majeure qui habitent la région de Tébessa seulement. Les CGR transfusés étaient phénotypés et filtrés et compatibilisés dans 95% des cas, (5% restants pour les cas très urgents ou le sang doit être délivré rapidement). La majorité des patients sont des enfants avec une légère prédominance féminine ; Le phénotype majoritaire est le CceKneg (52%) suivi du CcEe K neg (17%). La majorité des patients ont été transfusés depuis leur naissance par du sang total non phénotypé, par conséquent: 90% ont développé des allo-anticorps anti érythrocytaire, 2 patients ont arrêté leur scolarité très tôt 4 %, un patient présente un syndrome dysmorphique, 2 patients avec hépatomégalie importante et un cas d'hépatite B positif. **Conclusion** : L'insuffisance thérapeutique de la B thalassémique majeure aura des conséquences sur la croissance et la survie des enfants, le respect du programme transfusionnel des patients, une chélation de fer suffisante et un suivi post transfusionnel rigoureux évitent ainsi le recours aux transfusions en urgence et assurant une survie prolongée des patients.

Analyse moléculaire du gène CARD15/NOD2 chez des patients atteints de la maladie de Crohn

Daoui Z(1), Hammada T(2), Benlahcen B(3), Abadi N(4), Satta D(5)
 (1) Laboratoire de biologie et génétique moléculaire, Université Constantine3. Faculté de médecine de Batna. (2) Service de Gastroenterologie CHU Constantine (3) Service de Médecine interne CHU Batna Université Hadj Lakhdar. Batna. (4) Laboratoire de biologie et génétique moléculaire, Université Constantine3 (5) Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire, Université Constantine 1.

Introduction : Trois mutations du gène CARD15 (R702W, G908R et 1007fs) sont susceptibles d'être impliquées dans la survenue de la maladie de Crohn (MC). **Objectifs** : Dans ce travail, notre objectif est d'évaluer les fréquences alléliques du polymorphisme G908R et de déterminer les corrélations génotype-phénotype chez des patients atteints de la MC. **Méthodes** : 73 patients diagnostiqués de la MC et 126 témoins, ont été inclus dans notre étude. Les dossiers cliniques ont été systématiquement examinés et les informations phénotypiques obtenues sont détaillées. Le génotypage de G908R est réalisé par la méthode de PCR-RFLP. **Résultats** : Dans notre échantillon, aucune mutation homozygote n'est retrouvée. Les mutations hétérozygotes sont détectées chez 9 patients. La fréquence allélique pour ce polymorphisme est 6,25%, et la fréquence correspondante chez les témoins sains est 3,70% (OR=1.77, P=0.23), nous avons noté qu'il n'y a pas de différences significatives des fréquences alléliques entre les malades et les témoins. Nous avons obtenu 31 patients ayant la forme iléocolique, 26 avec la forme de l'iléon, et 14 patients ayant une inflammation au niveau du côlon. **Discussion** : Dans notre étude, la fréquence de l'allèle mutant G908R est plus élevée chez les patients par rapport aux témoins, mais aucune association significative avec la MC n'a été vérifiée. Ces résultats sont en accord avec des études européennes et asiatiques. Phénotypiquement, le statut de la MC est similaire à celui décrit dans la population occidentale. **Conclusion** : Dans notre population d'étude, l'absence d'association entre ce gène et la MC n'exclut pas le fait que le gène CARD15/NOD2 est un élément clé de la réponse

immunitaire innée. La présence d'autres mutations à savoir (R702W et 1007fs) peuvent contribuer à l'élaboration et l'évolution de la maladie de Crohn. De plus, l'implication des facteurs environnementaux semble être importante.

LA CRYPTORCHIDIE ET LA GENETIQUE

N Brinis, H Benakcha, S Bekhcha, D Belmerdassi, S Aboubou
 Service de chirurgie pédiatrique, CHU Benflis Touhami, Batna.

La cryptorchidie de l'enfant est l'une des pathologies ambulatoire les plus fréquentes en chirurgie pédiatrique, sa prévalence est variable selon le type de l'étude et l'âge de la population étudiée et sa mesure permet de préciser l'histoire naturel de la cryptorchidie. La connaissance de sa physiopathologie est un préalable fondamental à son traitement, elle permet en effet de comprendre et de rationaliser la nécessité ou non d'un bilan complémentaire, le type de traitement (chirurgical ou médical), son timing idéal et les modalités de suivi des enfants cryptorchides. Plusieurs études récentes ont confirmé le rôle très important de la génétique dans la genèse de la cryptorchidie. Nous rapportons les résultats de notre observation concernant des cas familiaux de cryptorchidie dans la région des AURES entre 2008 et 2010.

Exploration du gène MEFV: résultats obtenus à partir d'une cohorte de 91 patients Algériens

Ait-Idir Djouher (1,2), Djerdjouri Bahia (1)

(1) Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene. (2) Faculté des Sciences, Université M'Hamed Bougara, Boumerdès

La fièvre Méditerranéenne familiale (FMF, OMIM 249100) fait partie des maladies auto-inflammatoires monogéniques, largement répandue dans le bassin Méditerranéen. Elle évolue par des épisodes fébriles récurrents et inflammatoires des séreuses à l'origine de douleurs. Les formes graves de la FMF se compliquent par une amylose rénale de type AA. Transmise selon un mode autosomique récessif, la FMF est due essentiellement à 5 mutations (p.E148Q, p.M680I, p.M694I, p.M694V et p.V726A) dans le gène MEFV en 16p13.3. En Algérie, le gène MEFV a été très peu exploré, faisant de la FMF une maladie méconnue et sous-diagnostiquée. Ainsi, cette étude a pour objectif l'identification des mutations caractérisant les patients FMF Algériens. Cette étude a porté sur 91 patients non apparentés et suspectés de FMF, recrutés des hôpitaux d'Alger et de Tlemcen. La recherche des mutations p.M694I, p.M694V et p.M680I a été réalisée par PCR-allèle spécifique, à partir d'ADN génomique extrait par "salting-out". Les résultats ont montré que 45 patients (49,45%) sont porteurs d'au moins une des mutations recherchées où la mutation p.M694I représente 65,85% des allèles mutés. Chez les patients mutés, le génotype M694I/M694I était prédominant (37,77%), suivi des génotypes M694I/M680I (15,55%), M694V/M694V (11,11%) et M680I/M680I (4,44%). 11 (24,44%) des patients mutés étaient hétérozygotes pour la mutation p.M694I. 24 patients ont développé une amylose rénale et dont 6 sont décédés suite à une insuffisance rénale terminale. En conclusion, cette étude a permis de confirmer la prédominance de la mutation p.M694I chez les patients FMF Algériens. Elle permet également d'orienter le diagnostic génétique vers la recherche de la mutation p.M694I en premier lieu devant une suspicion de la FMF, dès lors que les institutions de santé publique auront été sensibilisées sur la fréquence et la gravité de cette maladie.

Polypose adénomateuse familiale : expérience du service

N ZAH, S LAHMAR, T SAIB, H.B BEKADA

Service de chirurgie générale du CHU de Bab-El-Oued.

Introduction : La polypose adénomateuse familiale est une maladie génétique, qui se transmet de génération en génération. La prise en charge commence par la réalisation de test génétique vers l'âge de 12 ans. Une surveillance précoce et régulière basée sur la colonoscopie annuelle, permet de traiter ces polypes avant qu'ils ne dégèrent. Le traitement chirurgical, est le seul moyen de lutter efficacement contre le risque de cancer. **Objectif** : Décrire et déterminer le profil épidémiologique de la polypose adénomateuse familiale, en se basant sur des paramètres cliniques, radiologiques et évolutifs. **Matériel d'étude** : Notre étude est rétrospective, avait colligé 20

malades opérés sur une période de 10 ans, entre janvier 2003 et décembre 2012. L'âge moyen des patients était de 46 ans, avec prédominance féminine, sexe ratio = 1,86. Nous avons effectué pour tous les malades une coloproctomie ; réservoir en J avec iléostomie latérale de protection. **Résultats** : Nous avons observé 1 seul cas de décès, la morbidité avait concerné 04 malades, répartie entre 02 occlusions (50 %), 01 lâchage d'anastomose (25 %), 01 fistule recto-vaginale (25%). **Conclusion** : Nos résultats plaident en faveur d'une prise en charge exigeante pour la polyposse adénomateuse familiale, et impose une chirurgie lourde. Cette prise en charge permet d'améliorer considérablement l'espérance et la qualité de vie des personnes atteintes. Et les progrès réalisés, tant dans le domaine de l'imagerie médicale, que dans celui de la chirurgie, offrent encore des perspectives d'amélioration pour les années à venir.

Association entre le polymorphisme des gènes (ApoE, MTHFR) et la maladie d'Alzheimer dans une population nord constantinoise

TRARI Zahia (1), ABADI Nouredine (2), AOUAR Amaria (3), SATTA Dalila (4)

(1) Département de médecine/Faculté de médecine/Université de Batna, (2) Laboratoire de Biologie et Génétique moléculaire au CHU Constantine. (3) Département d'écologie et environnement-Université de Tlemcen (4) Département des sciences de la nature et de la vie-Université de Constantine.

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative. Sa prévalence augmente de façon exponentielle avec l'âge et elle est devenue un problème majeur de santé publique. Le déterminisme génétique de cette maladie est multiple. Plus de 90 % des cas sont de type sporadique à début tardif. L'objectif de notre recherche est d'explorer l'impact du polymorphisme de l'apoE, de la MTHFR et du profil lipidique sur la maladie d'Alzheimer, ainsi que le statut homocystéinémique, dans un échantillon de la population nord constantinoise. L'étude que nous avons entreprise est de type cas/témoins : 20 patients et 30 sujets sains. Nous avons réalisé notre travail en utilisant les méthodes suivantes : un interrogatoire du sujet, un bilan lipidique et un dosage de l'homocystéine, l'extraction de l'ADN, la détermination du génotype de l'apoE et de la MTHFR, le gène de l'apolipoprotéine E constitue le seul facteur de susceptibilité génétique reconnu. La fréquence de l'allèle ε4 dans notre étude est quatre fois plus élevée dans le groupe malade que dans le groupe témoins présentant une variation de 20.83%. Ainsi que, nos fréquences génotypiques et alléliques confirme l'hypothèse d'un effet délétère de l'apo E4 par rapport à l'apo E3. La mutation C677T du gène de la MTHFR ne montre aucune différence significative entre les témoins et les MA. Nos résultats montrent une légère augmentation des taux des TC et des LDL et ils retrouvent une augmentation significative de taux de l'homocystéine chez le groupe malade par rapport aux témoins. Ces résultats corroborent la quasi-totalité des études. La confirmation de liens spécifiques entre déterminants vasculaires et maladie d'Alzheimer permettrait peut-être l'extension de procédures de traitement et de prévention des maladies cardiovasculaires aux démences.

Microdélétions du chromosome Y et infertilité masculine en Algérie

Djalila Chellat¹, Mohamed Larbi Rezgoune¹, Ken Mc Elreavey², Naouel Kherouatou¹, Sebti Benbouhadja³, Hamane Douadi⁴, Cherifa Benlatrèche¹, Nouredine Abadi¹, Dalila Satta¹

(1) Laboratoire de Biologie et Génétique moléculaire, Université Constantine 3, (2) Unité de génétique du développement humain, Institut Pasteur, 25 Rue Docteur Roux, Paris, France, (3) Centre de Chirurgie et des Sciences de la reproduction Ibn Rochd, Constantine, Algérie, (4) Laboratoire d'analyse médicale, Ibn Sina, Constantine, Algérie

Objectif : Le chromosome Y humain est essentiel pour la détermination du sexe humain et la spermatogenèse. Son bras long contient une région appelée facteur d'azoospermie (AZF). Les microdélétions dans cette région sont responsables de l'infertilité masculine. L'objectif de cette étude était de déterminer la fréquence des microdélétions du Y chez des patients algériens infertiles azoospermiques ou OligoAsthenoTeratozoospermiques (OAT) et de comparer la prévalence de ces anomalies avec d'autres pays et

régions dans le monde. **Méthodes** : Un échantillon de 80 hommes infertiles Algériens avec une faible numération de spermatozoïdes (1-20*106 spermatozoïdes par millilitre), ainsi que 20 hommes fertiles témoins a été analysé pour les microdélétions du chromosome Y. 49 hommes étaient azoospermiques et 31 hommes présentaient une OAT. L'ADN génomique a été isolé à partir de sang et la PCR a été réalisée avec un ensemble de 6 marqueurs STS AZFa, AZFb et AZFc pour détecter les microdélétions tel que recommandé par l'Académie européenne d'Andrologie. **Résultats** : Parmi les 80 hommes infertiles dépistés, un seul sujet a présenté une microdélétion dans la région AZFc (sY254 et sY255). le sujet est azoospermique (1/49, 2%). La fréquence globale de microdélétions AZF est faible (1/80 ; 1,3%). Ces mutations AZF n'ont pas été observées ni chez les sujets avec OAT ni chez le groupe témoin. **Conclusion** : Les fréquences des microdélétions AZF chez les hommes infertiles d'Algérie étaient comparables à ceux rapportés dans la littérature. Nous suggérons l'analyse des 6 STS pour détecter ces microdélétions du chromosome Y dans notre population d'homme infertiles présentant une infertilité idiopathique.

Etude des marqueurs génétiques (enzyme de conversion de l'angiotensine et méthylene tetrahydrofolate reductase) de l'infarctus du myocarde

o. semmame 1, n. abadi 2, k. benmbarek 2, d. chellat1, benchabi 2, shanachi 2.

(1) Département de biologie animale, université 1de Constantine, Algérie.; (2) faculté de médecine université 3 de Constantine, Algérie.

Introduction : Dans l'athérosclérose coronaire, il existe de nombreux gènes dont les produits sont impliqués dans le développement de la maladie et pour lesquels des polymorphismes génétiques ont été décrits. Parmi ceux-ci, le polymorphisme d'insertion/délétion du gène de l'ECA et le polymorphisme C677T du gène de la MTHFR. L'objectif de ce travail est de déterminer la corrélation de ces deux polymorphismes et la maladie coronarienne dans la population algérienne. **Méthodes** : Notre étude cas-témoin comporte une population de 320 sujets qui se subdivise en deux groupes : groupe de référence (160 sujets sains) et groupe pathologique (160 sujets présentant un IDM). Le génotypage du polymorphisme de l'ECA est déterminé par la méthode de PCR. Les génotypes D/D ont subi une deuxième PCR de confirmation de la délétion avec de nouvelles amorces. La détermination du polymorphisme de la MTHFR est réalisée par une PCR digestion utilisant l'enzyme de restriction Hinfl. **Résultats et discussion** : Chez le groupe des patients, il y a une fréquence plus élevée des génotypes DD (38.78%) et ID (46.26%) que les génotypes II (14.97%). Pour le groupe de contrôle les fréquences des trois génotypes DD, DI, et II sont respectivement 35.71%, 55.71% et 8.57% Pour le polymorphisme de la MTHFR, il n'y a pas de différence significative (p>0.05) des fréquences d'homozygotie entre les sujets témoins et les sujets avec IDM (respectivement 10.96% et 10.38%). Les résultats de notre étude concordent avec certaines études alors qu'ils discordent avec d'autres. **Conclusion** : Une relation de cause à effet de ces facteurs de risque ne peut pas être déduite seulement de cette association épidémiologique vu que certains patients ayant la maladie ne présentent aucun de ces facteurs de risque. Néanmoins l'étude de nouveaux marqueurs génétiques (ACE et MTHFR) ouvre des perspectives en matière de détection, de prévention et de traitement des pathologies cardiovasculaires.

Les empreintes génétiques en pratique judiciaire: Aspects juridiques et éthiques

BENABBAS EI-M, BOUAZIZ F, RAHMOUNI L, GUERFI M
Service de Médecine Légale C.H.U. de Batna

On désigne par « empreintes génétiques » les méthodes biologiques d'identification de personnes utilisées dans la pratique médico-légale et fondées sur les techniques de biologie moléculaire d'analyse du génome. L'identification d'une personne, victime ou suspecte, est une tâche fréquente en médecine légale. Toute technique d'identification s'appuie sur deux principes fondamentaux : le premier est la spécificité des caractères morphologiques de chaque individu, le second est la méthode comparative. Ces analyses permettent aujourd'hui d'identifier rapidement un corps, une tache de sang, de sperme, de cellules épithéliales par comparaison avec des résultats issus d'une famille. Ces analyses sont effectuées uniquement dans le

cadre d'une mission judiciaire. Les applications des empreintes génétiques en médecine légale sont multiples : Au cours des violences sexuelles, Identification de cadavres, Recherche de paternité.

L'intérêt de la détermination du polymorphisme génétique de l'IL28B dans la prise en charge des patients atteints d'hépatite C.

N Kalla, K Mokrani, A Ameghechouche, A Benyahia, H Mahdjoub, B Amrani, R Ait hamouda, S Tebbal.

Service des maladies infectieuses, EPH Batna.

L'hépatite virale C est un problème majeur de santé publique, sa prévalence mondiale est de 3%. Le traitement des hépatites C a beaucoup progressé et ces progrès thérapeutiques sont liés notamment à la meilleure connaissance de facteurs prédictifs de réponse dont la génétique de l'hôte. Plusieurs études ont mis en évidence des relations entre certains polymorphismes génétiques (rs12979860) et la clairance virale du VHC, qu'elle soit spontanée ou secondaire à un traitement. Ces études ont identifié plusieurs polymorphismes nucléotidiques situés sur le chromosome 19 en amont du gène IL28B et potentiellement impliqués dans la l'élimination virale. Dans la population générale on constate 03 catégories : C/C, C /T, T/T. chez les patients ayant une hépatite C de génotype 1 l'homozygotie C/C serait associée à une meilleur clairance virale spontanée et la réponse virologique soutenue (RVS) après une bithérapie est de l'ordre de 80% comparée aux génotypes C/T 40% et T/T 25%. Le polymorphisme de l'IL28B est l'un des facteurs prédictifs les plus puissants et sa détermination est importante dans la décision thérapeutique.

Apport de la génétique dans le traitement de l'hépatite c

N Kalla, K Mokrani, A Ameghechouche, A Benyahia, H Mahdjoub, B Amrani, R Ait hamouda, S Tebbal.

Service des maladies infectieuses, EPH Batna.

Chez les patients atteints d'hépatite virale c traités par bithérapie pégylé : à côté des facteurs prédictifs classiques liés au virus (génotype, charge virale) ou à l'hôte (fibrose, facteurs métaboliques) d'autres facteurs de réponse en particulier génétique ont récemment été identifiés. Plusieurs polymorphismes génétiques sont utiles pour la prédiction de la réponse virologique soutenue (RVS) à savoir : IL28B, IL6, IL10, TNFa et IFN ; mais aucun facteur n'a démontré son impact sur les décisions cliniques sauf le polymorphisme IL28B qui est considéré comme bon prédicteur de réponse. Les polymorphismes du gène codant la vitamine D et la protéine IP pourraient également jouer un rôle. La place de la génétique dans la prise en charge de l'hépatite virale c ne se limite pas à la seule problématique de l'efficacité thérapeutique, mais récemment elle est impliquée dans la survenue d'effets indésirables. Elle a montré que la neutropénie et la thrombopénie seraient associées au polymorphisme rs469170 de SOCS3 et l'ITPA (triphosphatase inosine) est utile pour la prédiction de l'anémie induite par la ribavirine. L'utilisation de la combinaison de ces variants génétiques pourrait conduire à un traitement efficace et tolérable.

Profil épidémiologique des malformations congénitales et anomalies chromosomiques au CHU de Batna de 2008 à 2013

AOUIDANE.S, HARKET.W, HAMADI.W, BOUNECER.H SEMEP-CHU BATNA

Les anomalies congénitales constituent un problème de santé publique et d'importantes causes de mortalité, de morbidité chronique et d'incapacité de l'enfant dans de nombreux pays et fait donc intervenir de multiples services ; La Diversité des causes de malformations congénitales et leur impact sur les sujets atteints, leur famille, le système de soins et la société ont imposé, pour diminuer la fréquence de certaines d'entre elles, tout un éventail d'approches préventives, La surveillance de ces anomalies est indispensable afin de détecter des variations de fréquence inexplicées et ainsi à identifier au plus tôt l'apparition de molécules tératogènes. **L'objectif** de notre étude est de dresser un profil épidémiologique des malformations congénitales et anomalies chromosomiques au CHU de BATNA de la période de 2008 à 2013. **Matériel et méthode** : Il s'agit d'une étude descriptive rétrospective des malformations congénitales et anomalies chromosomiques au niveau du CHU de

Batna, par consultation des dossiers des patients, registres d'hospitalisation et de décès, de 2008 à 2013. **Résultat** : 2475 cas de malformations congénitales et anomalies chromosomiques ont été hospitalisés au niveau du CHU de Batna, Le Spina Bifida est l'anomalie la plus fréquente avec un taux de 17.49 % suivi par l'ectopie testiculaire avec un taux de 09.09 %. Les malformations congénitales et les anomalies chromosomiques représentent un taux très important de la morbidité hospitalière dans notre CHU, d'où l'intérêt d'une meilleure surveillance par la création de registres de ces pathologies ainsi qu'une prévention et prise en charge adéquates ainsi que l'encouragement de la recherche scientifique dans ce domaine.

Association entre le polymorphisme des gènes (APOE, MTHFR) et la maladie d'Alzheimer dans une population nord constantinoise

ABADI Nourredine, AOUAR Amaria, SATTA Dalila, TRARI Zahia

Biologie et génétique moléculaire- Constantine. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers- Université de Tlemcen

La maladie d'Alzheimer est l'affection la plus répandue d'un vaste ensemble de maladies que l'on appelle 'maladies neurodégénératives'. Il s'agit d'une maladie cérébrale irréversible, caractérisée par une détérioration des facultés cognitives et de la mémoire, causée par la dégénérescence progressive des cellules du cerveau. La prévalence de cette pathologie augmente de façon exponentielle avec l'âge et elle est devenue un problème majeur de la santé publique. Le déterminisme génétique de la maladie d'Alzheimer est multiple. Plus de 90 % des cas sont de type sporadique à début tardif. L'objectif de notre recherche est d'explorer l'impact du polymorphisme de l'apo E, de la MTHFR et du profil lipidique sur la maladie d'Alzheimer, ainsi que le statu homocystéinémique, dans un échantillon de la population nord constantinoise. L'étude que nous avons entreprise est de type cas/témoins, elle a duré 2 ans et a porté sur deux types de populations : 20 patients et 30 sujets sains. Nous avons réalisé notre travail en utilisant les méthodes suivantes : Un interrogatoire du sujet. Les prélèvements ont été effectués sur des sujets à jeun d'au moins 10 heures, pour réaliser le bilan lipidique. Un test immunodosage par compétition pour le dosage de l'homocystéine. L'extraction de l'ADN par la technique au NaCl. La détermination du génotype de l'apo E et de la MTHFR par la méthode PCR/RFLP. Pour traiter nos résultats selon différents paramètres et facteurs nous avons fait des calculs statistiques : test de l'ANOVA et l'Odds-Ratio. Le gène de l'apolipoprotéine E constitue le seul facteur de susceptibilité génétique reconnu. La fréquence de l'allèle ε4 dans notre étude est quatre fois plus élevée dans le groupe malade (27.5%) que dans le groupe témoins (6.67%) présentant une variation de 20.83%. Ainsi que, nos fréquences génotypiques et alléliques confirme l'hypothèse d'un effet délétère de l'apo E4 par rapport à l'apo E3, cependant les effets de l'allèle ε4 ne sont souvent mis en évidence qu'avec un effectif important de patients. La mutation C677T du gène de la MTHFR ne montre aucune différence significative entre les témoins et les MA. Nos résultats montrent une légère augmentation des taux des TC et des LDL chez les malades par rapport aux témoins. Ces résultats concordent avec certaines études effectuées à travers le monde, mais les arguments prouvant le lien entre le profil lipidique sérique et la maladie d'Alzheimer sont encore fragmentaires et controversées. Notre étude retrouve une augmentation significative de taux de l'homocystéine chez le groupe malade par rapport aux témoins. Ces résultats corroborent la quasi-totalité des études. La confirmation de liens spécifiques entre déterminants vasculaires et maladie d'Alzheimer permettrait peut-être l'extension de procédures de traitement et de prévention des maladies cardiovasculaires aux démences. La connaissance des différents facteurs de risque de cette maladie reste donc primordiale dans le but non seulement de mieux comprendre la pathogénie de la maladie mais aussi de la prévenir a fin d'en diminuer l'incidence.

Association des gènes FTO et CRP au syndrome métabolique

M. Makrelouf (1), L. Douaibia (1), R. Attaoua (2), A. Otmane (1), A. Boukli (1), A. Zenati (1), F. Grigorescu (2)

(1) Laboratoire de biochimie génétique, CHU Bab el-Oued, Université

Alger 1, (2) Laboratoire d'endocrinologie moléculaire, UMR204 NUTRIPASS, IURC, Montpellier..

Introduction : Le syndrome métabolique (SMet) est un désordre complexe associé à un risque cardiovasculaire élevé. Son origine est multifactorielle, résultant de l'interaction entre facteurs génétiques et environnementaux. L'identification des facteurs de susceptibilité génétique au SMet fournit des précieux outils pour la compréhension de sa physiopathologie et potentiellement pour mieux les prévenir. Nous nous sommes intéressés aux génotypage de deux gènes candidats du SMet : FTO et CRP dont plusieurs études de GWAS ont rapporté leur association à ce syndrome. **Patients et méthodes :** Nous avons étudié leur association au SMet dans un échantillon d'individus recrutés dans les régions d'Alger et de Tlemcen (n = 350) bien caractérisée sur le plan métabolique. La prévalence du SMet était de 27,2 %. Le génotypage des SNP rs1421085 (T/C) et rs3091244 (C/T), marqueurs des gènes FTO et CRP, respectivement a été effectué par la technique KASPar tandis que l'analyse statistique a été réalisée par StatView. **Résultats :** Nous avons constaté un dosage génique du FTO avec l'accumulation des composantes du SMet (0 % ; 11,3 % ; 24,5% ; 19,4 % et 38 % dans les groupes d'individus avec aucun, 1, 2, 3, 4 critères de SMet, respectivement). Nous avons aussi observé la corrélation du génotype CC du gène CRP avec des valeurs plus élevées de tour de taille (101,4 ± 1,1 vs 98,1 ± 1,1 cm ; P < 0,039) alors que le génotype TT corréle avec des taux de glycémie à jeun plus faibles (1,13 ± 0,05 vs 1,31 ± 0,05 mg. dl), P < 0,039). Enfin, le génotype CC du FTO corréle avec des niveaux de glycémie à jeun plus importants (1,41 ± 0,1 vs 1,19 ± 0,0 mg/dl, P < 0,018). **Conclusion :** Cette étude a mis en évidence une corrélation du gène FTO avec l'accumulation des composantes du SMet ainsi qu'une corrélation du gène de la CRP avec le tour de taille et la glycémie à jeun au sein de la population algérienne. D'autres gènes sont en cours d'exploration afin de mieux comprendre le fond génétique du SMet dans notre population en comparaison avec d'autres populations.

Anomalies génétiques et Diabète sucré

N Benzid

Endocrinologue libéral, Batna

La relation entre le diabète sucré et certains troubles génétiques est établie dans la théorie ainsi que dans le rôle contributif de la génétique dans la genèse de DT2 qui reste prouvé avec une fréquence de 2 à 5%. L'identification de certains syndromes génétiques et notamment la mise en évidence de certains mutations du gène de l'insuline et du récepteur de l'insuline a permis a priori de prévoir l'atteinte et la prise en charge précoce d'un diabète sur terrain polymalformatif préexistant. Par contre, le DT1 ne semble pas être plus fréquent que dans la population générale. Dans notre approche clinique l'association dans une même famille d'un diabète sucré avec un syndrome de Turner et d'un syndrome de Bardel-Biedel (Laurence Moon) est notée avec une diversité clinique notable.

Etude de la valeur prédictive de la fragmentation d'ADN spermatique pour le succès de la fécondation in vitro par microinjection intracytoplasmique de spermatozoïde

BOUSHABA Sara, M. Sc 1, BELAALLOUI Ghania, MD, PhD 2

(1) Département des sciences de la nature et de la vie, Faculté des sciences, Université Hadj Lakhdar Batna. Algérie. (2) Département de médecine, Université Hadj Lakhdar. Batna. Algérie

Introduction : Le traitement des couples stériles a été bouleversé par la technique de l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) qui exige une parfaite identification des paramètres spermatiques: numération, morphologie et mobilité de spermatozoïdes. Cependant, ces paramètres n'informent pas sur l'intégrité de l'ADN spermatique qui est essentielle pour s'assurer que le spermatozoïde fécondant puisse soutenir le développement embryonnaire normal du zygote. **Objectif :** La détermination d'une relation, exprimée par la valeur prédictive, entre la fragmentation de l'ADN spermatique (FAS) et la réussite de l'ICSI. **Patients et méthodes :** L'intégrité de l'ADN spermatique de 26 patients candidats à l'ICSI a été mesurée par le test de SCD (Sperm Chromatin Dispersion) en utilisant un sperme préparé par la centrifugation en gradient de densité. **Résultats :** Nous n'avons pas trouvé de

différence significative entre les couples avec un IFA≤30% et ceux avec un IFA>30% du point de vue grossesse biochimique et clinique et de la naissance. Cependant, la qualité des embryons a été significativement meilleure chez les couples avec un IFA>30% (83,765 ± 7,885% vs 16,234 ± 7,885%, p <0,0001 pour IFA>30% et IFA≤30% respectivement). **Conclusion :** La FAS n'a pas de valeur prédictive pour l'ICSI qui est donc un traitement conseillé pour les patients avec un taux élevé de cassures de l'ADN spermatique.

Génétique et rhumatismes

Samy SLIMANI

Département de Médecine, Université de Batna

La génétique et l'environnement sont importants dans la genèse et la pérennité de toutes les affections. D'habitude, les interactions entre les deux facteurs produit un phénotype propice au développement de la maladie, avec des poids variés de chaque facteur. Les affections rhumatismales purement génétiques ou purement environnementales sont quasi-inexistantes. Des outils sont à notre disposition afin d'étudier la base génétique des pathologies rhumatismales les plus fréquentes, ainsi que pour déterminer la façon dont laquelle ces facteurs interagissent avec les principaux facteurs environnementaux (infection, alimentation, sport, pollution). Les observations de cas familiaux et de disparités ethniques des différentes affections rhumatismales, qu'elles soient inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde, spondyloarthrites, maladies systémiques) ou mécaniques (arthrose, tendinite multiple) était la base à la découverte de nouveaux gènes associés à ces maladies. Malheureusement, la prise en charge de ces affections en se basant sur la compréhension de leurs bases génétiques est encore à venir.

NEUF ANNEES D'EXPERIENCE DANS LA PRISE EN CHARGE DU GLAUCOME CONGENITAL AU CHU DE BATNA 2004-2012

ROUGUI MF, BEICHI F, BOUNECER H, NOURI MT, DUFIER JL

Service d'ophtalmologie, CHU Batna

Introduction

L'incidence du glaucome congénital primitif n'est que de 1 cas sur 1-020 000 naissances en Occident; elle est en revanche plus élevée au Moyen-Orient et au Maghreb. En Algérie, bien que sa fréquence ne soit pas encore chiffrée, le glaucome congénital représente la première cause de cécité de l'enfant, plus d'un quart de la population dans les écoles des malvoyants en Algérie est constitué par des glaucomeux. Notre objectif est de déterminer les aspects socio-démographiques et cliniques des cas de glaucome congénital pris en charge au niveau du Centre Hospitalo-Universitaire de Batna. **Matériels et Méthodes :** C'est une étude prospective de type descriptif, portant sur 92 cas de glaucome congénital primitif classique, pris en charge au niveau du service d'Ophtalmologie au CHU de Batna, de Janvier 2004 à Décembre 2012. **Résultats :** La taille de notre série est de 166 yeux, l'âge moyen au moment du diagnostic est de 06 mois 1/2, La notion de consanguinité est présente dans plus de 65% des cas et 24% de cas familiaux. Plus de la moitié de nos cas sont originaires de la wilaya de Batna. Le premier signe d'appel est la mégalocornée, présent dans 26% des cas. En préopératoire, la pression intraoculaire moyenne était de 23 mm Hg (VN : 4-10 mm HG), le FO était accessible seulement dans 43% montrant un Cup/Disc moyen de 0,6 (VN < 0,3). **Discussion :** La consanguinité est présente dans 66.15 % des cas, ce taux se rapproche de celui d'une étude Turque (66,6 %). Dans la littérature le taux est variable selon les populations et les séries d'études. Chez les cas familiaux, on a trouvé la notion de consanguinité présente dans 86,66%. Le taux des cas familiaux, la consanguinité et l'absence des stigmates de la maladie chez les parents font que la mode de transmission du glaucome congénital primitif dans notre étude, est essentiellement récessif autosomique. Dans la littérature, la photophobie avec larmoiement clair et blépharospasme constitue le premier signe d'appel, On peut expliquer cette différence de la nature du premier signe d'appel, par le retard diagnostique qui est due principalement au retard de consultation spécialisée dans notre étude. L'œdème de la cornée a été noté dans 80.02 %, Il est de 70 % pour Sekkat A. au Maroc. **Conclusion :** Le glaucome congénital est à la fois une maladie dans les formes primitives et un symptôme dans les formes secondaires à une dysgénésie du segment antérieur. Le glaucome congénital primitif classique représente 92 % des glaucomes

congénitaux dans notre région, il est nettement plus important que dans les pays occidentaux vu le taux de consanguinité très élevé.

La luxation congénitale de la hanche. Prise en charge thérapeutique chez le NN et le nourrisson. À propos de 111 hanches

N. Khernane, T. Boussaha, N. Hannachi, K. Benyahya, H. Mahkhoulfi
Service de chirurgie orthopédique et traumatologique CHU Batna

La luxation congénitale de la hanche (LCH) est d'une anomalie de positionnement de la tête fémorale dans l'acétabulum, elle peut être uni ou bilatérale. Elle se définit comme étant une maladie multifactorielle, qui fait intervenir des facteurs mécaniques et des facteurs génétiques. En Algérie, l'absence d'une politique nationale de prévention a conduit à un diagnostic et à une prise en charge tardifs. 134 enfants âgés de 18 mois à 15 ans ont été opérés au niveau de notre service. En rappelant que la chirurgie de la luxation congénitale de la hanche après l'âge de la marche est une chirurgie lourde, agressive et non dénuée de complications. Ce qui nous a poussés à établir une stratégie de prévention basée sur l'examen clinique de nouveau-né, de poser le diagnostic à temps et de traiter précocement. Ainsi le dépistage néo-natal est né. Cents onze hanches (111 hanches) ont été traitées chez 81 enfants, dont l'âge moyen est de 40 J (3j - 240j), ils sont originaires de Batna (60 %) et des villes limitrophes (40%). Le sex-ratio est de 2/1 (30 garçons et 51 filles), les facteurs de risques majeurs sont fréquents (22,2% positions de siège et 8,1 d'antécédents familiaux). Par ailleurs l'enquête sur les facteurs mineurs a trouvé le résultat suivant : 51 filles de sexe féminin, 35 mères primipares, 30 cas de césariennes, 14 gros bébés, 42 cas notions d'emballage, 18 cas notions de consanguinité, 2 cas de gémellité et toute la race était blanche. Le diagnostic a été échographie-radio-clinique, le traitement a été simple, non agressif, consiste à une immobilisation par des coussins d'abduction et des appareils type Harnais de Pavlik. Le résultat a trouvé 68 guérisons et 13 échecs (hanches irréductibles, reluxées). En conclusion : la physiopathologie de la luxation de la hanche reste encore obscure, cependant des facteurs mécaniques type postures luxantes et les facteurs génétiques sont fortement incriminés dans la genèse de cette maladie. Par ailleurs le dépistage néonatal et la prise en charge précoce sont considérés comme une obligation médico-légale.

L'ostéogénèse imparfaite : la place du traitement chirurgical A propos de 11 cas

N. Khernane, T. Boussaha, F. Namouchi, Madjor, H. Mahkhoulfi
Service de chirurgie orthopédique et traumatologique CHU Batna

Introduction : L'ostéogénèse imparfaite est une ostéoporose congénitale héréditaire, secondaire à une mutation dans l'un des 2 gènes qui code pour les chaînes alpha du collagène de type I. Le but de notre travail est de mettre en exergue la place du traitement chirurgical dans la prise de l'ostéogénèse imparfaite, celle-ci exige un traitement complet interdisciplinaire; médical, chirurgical et rééducatif. **Matériel :** Nous rapportons ici 10 enfants et 1 adulte, qui se sont présentés pour des fractures pathologiques parfois multiples et récidivantes et des déformations des os longs. L'âge est compris entre de 2 ans et 12 ans, celui de l'adulte est 50 ans. Ils sont originaires de Batna, Mérouana et de Jijel. Tous de sexe masculin sauf la fillette de 2 ans. Tout le squelette est concerné notamment les os des membres inférieurs. Il est à noter que l'enfant de 2 ans nous a posé un problème de diagnostic celui-ci est confirmé par l'équipe d'orthopédie pédiatrique de l'Hôpital de Necker de Paris. **Méthodes :** Le traitement chirurgical a concerné 5 enfants dont le nombre des foyers de fractures est 9, intéressant les hanches (col de fémur), les diaphyses fémorales et les 2 os de la jambe (le tibia). Les incursions sont importantes, dont l'angle de la déformation peut atteindre parfois les 90°. Quant aux restes des patients ont été traités orthopédiquement (contention plâtrée). **Résultats :** La consolidation osseuse a concerné tous les malades sauf un seul enfant qui a été opéré pour une pseudarthrose de la diaphyse fémorale (1/3 supérieur). Cependant on note une récurrence de la déformation de la jambe pour un autre. **Discussion** La chirurgie a pour but de stabiliser le foyer fracture et de corriger l'axe de os longs et celui des membres inférieurs, afin de soulager et verticaliser le patient, et le confier après au rééducateur. Cependant il reste insuffisant, car la prise en charge est

multidisciplinaire, le rééducateur entretient la force musculaire et prévient les déformations par des orthèses, le pédiatre renforce l'os en prescrivant les biphosphonates selon le schéma thérapeutique international en milieu hospitalier. **Conclusion :** Pathologie difficile à traiter, l'ostéogénèse imparfaite n'est pas prise en charge correctement dans notre pays. Les enfants ainsi que leurs parents en souffrent énormément, il est de notre devoir de s'en occuper d'avantage.

Phénylcétonurie à Batna : Réalité et perspectives

N.Messaadia(1), G. Rebiaa(2), H.Baaziz(3), H.Benaldjia(1), S.Lebalta(3), H.Bounecer(3)
(1) EPSP Batna ; (2) EPH Merouana ; (3) CHU Batna

Introduction : La phénylcétonurie (PCU) est une maladie génétique grave qui peut entraîner un handicap mental. Elle est due au déficit en une enzyme hépatique : la phénylalanine-hydroxylase qui permet la transformation de la phénylalanine en tyrosine. Seul un diagnostic précoce et un traitement immédiat (régime avant le 3ième mois de vie) évitent à ces enfants des troubles neurologiques graves : retard mental, troubles du comportement, psychoses, spasmes en flexion, épilepsie,... Dans le monde : la maladie concerne un nouveau né sur 16000, avec d'importantes variations entre les divers pays. En Europe la prévalence de la maladie est mieux connue grâce au système de dépistage néo natal : Environ 1 enfant sur 10 000 né en Europe, 1573 cas ont pu être diagnostiqués dès la naissance entre 1972 et début 2006 en France. En Algérie : 400 cas ont été recensés mais ce chiffre ne reflète pas la réalité surtout que cette maladie rare est très répandue par rapport aux autres maladies orphelines. **Objectif de l'enquête est de décrire :** Les circonstances de découverte et la qualité de la prise en charge des cas enregistrés au niveau de l'EPSP BATNA (une série de 8 cas). **Matériel et Méthode :** Il s'agit d'une enquête descriptive rétrospective par un questionnaire composé de deux parties : une partie destinée aux parents des malades et une partie aux médecins traitants. **Résultats en cours**

Prédispositions génétiques dans les cancers des VADS (Voies Aérodigestives Supérieures)

Yacine Amourache
ORL et Chirurgie Cervico-faciale CHU Batna

Il est actuellement admis que le cancer est une maladie multifactorielle, le facteur génétique (prédisposition génétique) constitue un de ces facteurs essentiels. Auparavant cette prédisposition génétique a été observée et confirmée chez les cas familiaux de cancer et notamment dans les cancers des VADS dont nous rapportons un cas familial discuté à travers une revue de la littérature. D'après de nombreuses études la survie des cancers des VADS ne semble pas être considérablement modifiée malgré une prise en charge diagnostique et thérapeutique de qualité. Avec les progrès de la génétique et surtout la génétique moléculaire, il est apparu intéressant voire nécessaire de disposer de marqueurs génétiques et de préciser leur rôle en tant qu'outils diagnostic, pronostic et thérapeutique (thérapie génique).

Syndrome de Turner : polymorphisme clinique et génétique. Expérience du service de pédiatrie CHU Batna.

H. Baaziz (1); N.Rebiaa(2); Y.Uchen(3); S.Bicha (4) ; I.Mazhoud (5); Z. Bouderd(4).
(1) Service de pédiatrie, CHU Batna, (2) Service de pédiatrie, EPH Ziza Massika - Merouana -Batna. (3) Pédiatre installé, Batna, (4) Service de pédiatrie, CHU Constantine, (5) Service de pédiatrie, EPH Elbir Constantine.

Introduction: Le syndrome de Turner est une anomalie chromosomique rare liée à l'absence totale ou partielle d'un des deux chromosomes X. Il est caractérisé par un grand polymorphisme clinique et cytogénétique où le retard de croissance statur pondérale constitue un signe quasi constant. Le diagnostic est posé souvent tardivement vu la diversité des tableaux cliniques et la méconnaissance de la maladie par les praticiens. **Objectif:** Nous rapportons une série de 10 cas de syndrome de Turner dont le but est de souligner le polymorphisme clinique et cytogénétique. **Matériel et méthodes:** À partir d'une consultation d'endocrinologie

pédiatrique, nous avons colligé, 10 cas de syndrome de Turner sur une période de 04 ans (2010-2014). Les malades ont eu un examen clinique complet avec une évaluation de la croissance staturo-pondérale selon les courbes de l'OMS, des examens para-cliniques comportant un caryotype, l'étude FISH pour 02 malades, des radiographies du poignet et du squelette, une échographie abdomino-pelvienne, une échocardiographie, les Ac anti transglutaminase, le dosage pondéral des IgA, le bilan thyroïdien, les Ac anti TPO, FSH, LH, NFS, glycémie, HBA1c, un bilan lipidique, un bilan hépatique et phosphocalcique avec un examen spécialisé ORL, ophtalmologique et psychologique. **Résultats** : 10 cas de syndrome de Turner ont été retenus. L'âge moyen au moment du diagnostic était de 08ans et 03 mois [07 mois-18 ans et 08 mois]. Le motif de consultation était le retard de croissance staturo-pondérale dans 100 % des cas, associé à un retard pubertaire dans un cas et un lymphœdème dans un autre cas. La taille moyenne au moment du diagnostic était à - 3,5 DS et l'âge osseux moyen était 05ans et 02 mois. Le RCIU est retrouvé dans 04 cas. Le ptérygium colli est noté dans 04 cas, l'implantation basse des cheveux dans 05 cas, l'aspect bombé du thorax dans 08 cas et les naevi dans 03 cas. L'atteinte orthopédique est retrouvée dans 07 cas, l'atteinte cardiaque dans 03 cas, les otites récidivantes dans 04 cas, la surdité dans 03 cas et les troubles de la réfraction dans 03cas. 02 filles ont à la fois une thyroïdite auto-immune et une maladie cœliaque associée et une autre a uniquement la thyroïdite auto-immune. L'alopecie est retrouvée dans un cas et le psoriasis dans un autre cas. Les troubles de mémoire et de l'attention ont été retrouvés dans 07cas. Le caryotype retrouve une monosomie 45X0 dans 05 cas, les anomalies structurales type isochromosomie du bras long du X dans 03 cas et une mosaïque dans 02 cas. 08 cas/10 reçoivent le traitement par hormone de croissance d'une manière régulière, 02 malades ont bénéficié d'un traitement par L-thyroxine avec un régime sans gluten et le traitement oestro-progestatif est utilisé chez deux filles. **Conclusion** : le syndrome de Turner est très polymorphe d'où l'intérêt de pratiquer un caryotype chez toute fille qui présente un retard de croissance staturo-pondérale inexpliqué ou un lymphœdème néonatal.

Syndrome de Sensenbrenner – a propos d'une famille

A. BOUGROURA, A. CHINAR, F. LAHOUEL, Z. LALMI, H. BOUKHENTICHE, S. BENAHMED, I. FELLAHI.

Service de néphrologie et d'hémodialyse. CHU Benflis Touhami. Université Hadj Lakhdar. Batna

Introduction : Le syndrome de Sensenbrenner est l'exemple rare des maladies autosomiques récessives ; ou il y'a moins de 12 cas dans le monde ; appelé aussi : dysplasie ecto-dermal , caractérisée par une rétinopathie pigmentaire , associée a une atteinte rénale (néphrite interstitielle) et d'autres malformations ecto - dermales moins typique. **Patients et méthodes** : Nous vous rapportons dans ce travail le cas d'une famille avec cinq enfants dont trois atteints par cette maladie (une fille et deux garçons) deux déjà au stade de dialyse et le dernier il est en insuffisance rénale chronique pré dialyse, et les trois frères présentent d'autres malformations identiques très évocatrices de syndrome de Sensenbrenner. **Résultat** : Pour nos patients après la biopsie rénale et l'étude génétique du 2eme garçon et les deux parents on a pu confirmer le diagnostic de cette pathologie rare. **Discussion** ; le syndrome de sensenbrenner est une pathologie rare, responsable d'handicaps multiples ; ophtalmiques , rénales , et même cardiaque rend la prise en charge de ses patients très délicate , ou il faut savoir évoquer le diagnostic dont la confirmation est uniquement par l'étude génétique .

Thérapie génique dans l'adrénoleucodystrophie, a propos d'une famille : « de Constantine à Boston »

Bourbia

L'adrénoleucodystrophie (ALD) liée à l'X est une maladie orpheline neurodégénérative grave caractérisée par: 1) une insuffisance surrénale périphérique, 2) Une démyélinisation du système nerveux central et périphérique, 3) Une accumulation plasmatique des Acides Gras à très longues chaînes (AGTLC). La maladie est liée à une mutation du gène ABCD1 et l'association de l'atteinte cérébrale et surrénalienne est probablement liée à l'accumulation plasmatique et tissulaire des AGTLC. La confirmation diagnostic se fait par le dosage

plasmatique des AGTLC qui sont élevés chez 100 % des garçons ou des adultes hommes atteints et 80-95 % des femmes conductrices. L'évolution de la maladie peut être lente (essentiellement les formes périphériques) ou plutôt rapide et fatale dans les formes centrales, non précocement traitées et avant même l'apparition des signes neurologiques. Les thérapeutiques actuelles sont l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (limitée par le manque de donneurs compatibles et par les complications graves du traitement) et la thérapie génique. Ces deux traitements sont efficaces: stabilisation des lésions avec un recul de 15 ans (allogreffe) et 7 ans (thérapie génique), à condition d'être proposés avant l'apparition des signes neurologiques. **Cas clinique** : Nous rapportons le cas de deux frères, âgés de 6 et 5 ans, issus d'un mariage non consanguin, adressés par un pédiatre pour avis sur une insuffisance surrénalienne périphérique. Il n'y avait pas d'orientation clinique vers un bloc enzymatique ou une ambiguïté sexuelle, mais devant les taux d'ACTH très élevés et les troubles de concentration et l'hypoacousie chez l'un d'eux, une IRM cérébrale a été demandée et est revenue en faveur d'une démyélinisation symétrique sévère de la substance blanche évoquant une ALD chez lui. Une IRM de dépistage a été réalisé chez le frère et a montré des lésions inflammatoires du Splenium calleux. Un dosage des AGTLC a été effectué chez les deux frères et leur mère ce qui a révélé des taux supérieurs à la normale chez ces derniers. La collaboration avec des équipes de neuropédiatres à Paris et à Boston a permis de trouver une prise en charge pour une thérapie génique de l'enfant atteint de la maladie mais encore asymptomatique. **Conclusion** : Le diagnostic d'ALD doit être discuté devant toute insuffisance surrénale chez l'enfant sans orientation vers une cause habituelle et en particulier dans les cas où le taux d'ACTH est très haut.

Panel d'examens phénotypiques et génotypiques des maladies héréditaires avec retard mental pratiqué dans notre laboratoire

B.Imessaoudene ; M.H. Chérifi, MA. Ghouali ; S.Hallal,

Le retard mental (RM) et le trouble du comportement chez l'enfant constituent la cause la plus fréquente des consultations en pédiatrie et en neurologie. Les principales causes du RM peuvent être d'ordre métabolique ou génétique. Les maladies métaboliques impliquées dans le processus du RM résultent d'un déficit enzymatique sur l'une des nombreuses voies biochimiques, dérivées des Glucides, protides, lipides et des bases puriques et pyrimidiques. Les gènes impliqués dans cette pathologie sont fort nombreux (on dénombre plus de 1000 entrées sur OMIM), d'autres restent à découvrir. La prise en charge biologique de certaines maladies métaboliques et génétiques est réalisée depuis plusieurs années par notre laboratoire. On reçoit des demandes des hôpitaux de différentes régions du pays. La mise sur le marché ces dernières années de médicaments pour certaines maladies du métabolisme a bouleversé l'attitude des cliniciens, des biologistes et les parents d'enfants malades vis à vis de ces pathologies. On se propose dans cette communication de présenter notre expérience et le bilan de notre activité dans le diagnostic phénotypique et génotypique du retard mental

Apport de la cytogénétique au diagnostic du retard mental, expérience de notre laboratoire .

Aït Abdelkader Belaid (1,2), Boughalem Aicha(1,2), Arabi (2),Chikouche Ammar (1, 2), Aït Abdallah Malika (2), Fadel Ouidad (2), Amarouche Kenza (2), Sidi Said Tania (2), Aberrane Karima (2), et Griene Lakhdar (1, 2).

(1) Laboratoire d'Hormonologie, Centre Pierre et Marie Curie - Alger. (2) Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, Université d'Alger 1.

Le retard mental (RM), handicap majeur qui concerne près de 3 % de la population générale, constitue un motif fréquent de consultation en pédiatrie et en neuropédiatrie. La prise en charge médicale adaptée de l'enfant présentant un RM nécessite l'identification étiologique de cette affection, qui est aussi essentielle pour : - Répondre aux demandes d'explications et aux interrogations légitimes des parents. - Avancer un pronostic. - Permettre un conseil génétique. Historiquement, la première description d'une anomalie chromosomique, rapportée en 1959, était l'identification par caryotype d'un chromosome 21 surnuméraire (aneuploïdie), chez

une patiente présentant un RM. Les innovations technologiques en génétique chromosomique (FISH/hybridation in situ par fluorescence et CGH array/hybridation génomique comparative ou ACPA/analyse chromosomique sur puces ADN) ont permis la description et l'identification de nombreux nouveaux syndromes associés à des anomalies chromosomiques spécifiques, qui se manifestent presque toujours par un phénotype particulier avec retard psychomoteur. **Patients et Méthodes** : Notre cohorte est constituée de 424 patients qui présentent un RM non syndromique (isolé ou nu) ou syndromique. Actuellement, pour aboutir au diagnostic d'anomalies chromosomiques dans le retard mental, les cytogénéticiens utilisent de façon consensuelle plusieurs techniques de cytogénétique classique et moléculaire : - Le caryotype standard et à haute résolution, - L'hybridation in situ par fluorescence (FISH), - L'analyse chromosomique sur puces ADN (ACPA). **Conclusion** : L'analyse cytogénétique de nos 424 patients, qui présentent tous un RM, s'est soldée par la caractérisation étiologique de 172 cas, ce qui correspond à 40% de la cohorte, chiffre légèrement supérieur à ceux retrouvés dans la littérature.

Analyses cliniques et génétiques des amyotrophies observées dans l'Est Algérien

Sifi. Y (1,2), Sifi. K (2,3), Boulefkhad. A (1, 2), Abadi. N (2,3), Benlatreche. C (2,3), Bonnefont. JP (4), Hamri. A (1,2)

(1). Service de neurologie, faculté de médecine, université Constantine 3, Algérie (2). Laboratoire de biologie et de génétique moléculaire, faculté de médecine, université Constantine 3, Algérie (3). Laboratoire de biochimie, faculté de médecine, faculté de médecine, université, Constantine 3, Algérie (4). Département de génétique, hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

Introduction : Les amyotrophies spinales (SMA) constituent un groupe de maladies neuromusculaires le plus souvent de transmission autosomique récessive. Elles résultent dans plus de 95 % des cas d'une délétion homozygote des exons 7 et 8 du gène SMN1 sans corrélation avec le phénotype. L'objectif de notre travail était de rapporter les caractéristiques cliniques et génétiques des SMA observées dans l'Est Algérien. **Patients et méthode** : Nous avons analysé de manière retro et prospective, le phénotype et le génotype de 92 patients atteints d'une SMA. Ils répondaient tous aux critères établis par le consortium international (Munsat T L et al 1991) et par Zerres et al (1997). L'analyse moléculaire était systématique, elle consistait à rechercher les délétions des exons 7 et 8 du gène SMN1 et des exons 4 et 5 du gène NAIP. Seuls les patients portant des délétions dans le gène SMN1 (soit 62 patients) avaient bénéficié d'un dosage du nombre de copies du gène SMN2. **Résultats** : Nos patients étaient repartis en 20 SMA de type I, 16 de type II, 53 de type III et 3 de type IV. La fréquence de délétions des exons 7 et 8 du gène SMN1 et des exons 4 et 5 du gène NAIP était respectivement de 75 et de 26 %. Le nombre de copies du gène SMN2 variait d'une copie à 5. Nous avons noté une corrélation inverse entre le nombre de copies SMN2 et la sévérité du phénotype, en effet plus le nombre de copies est élevé moins le phénotype est sévère. **Conclusion** : Les résultats de notre étude concordent avec de nombreuses données de la littérature.

La Maladie de Pompe infantile et de l'adulte: l'expérience du CHU de Constantine

Y. Sifi (1, 2), M. Medjeroubi (3), M. Piraud (4), K. Sifi (5, 2), N. Taghane (1, 2), H. Benmokhebi (3), and A. Hamri (1, 2)

(1) Service de neurologie, faculté de médecine de Constantine, université Constantine 3, Algérie. (2) Laboratoire de biologie et de génétique moléculaire, faculté de médecine de Constantine, université Constantine 3, Algérie. (3) Service de pédiatrie, faculté de médecine de Constantine, université Constantine 3, Algérie. (4) Laboratoire des Maladies Hérititaires du Métabolisme, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, France. (5) Laboratoire de biochimie, faculté de médecine de Constantine, université Constantine 3, Algérie.

Introduction : La maladie de Pompe (MP) est une maladie neuromusculaire de surcharge lysosomale causée par un déficit en -glucosidase acide (GAA) ou maltase acide, nécessaire à la dégradation du glycogène lysosomale. L'objectif de notre travail était de rapporter

la présentation clinique et le profil évolutif des formes infantiles et de adulte de la (MP) observée dans l'Est Algérien. **Patients et méthode** : Notre étude a été réalisée aux services de neurologie et de pédiatrie du CHU de Constantine. De 2001-2012, nous avons colligé 6 dossiers de patients atteints de (MP). Tous nos patients ont bénéficié d'un examen neurologique minutieux et d'un bilan cardiovasculaire complet. Le dosage des CPK, LDH, TGO et TGP était systématique. L'ensemble des patients a bénéficié d'un dosage leucocytaire de la (GAA). L'analyse moléculaire a été réalisée chez 2 patients. **Résultats** : Tous les patients étaient de l'Est Algérien, il s'agissait de 3 nourrissons et de 3 adultes, le tableau clinique était classique, dominé chez les nourrissons par l'atteinte cardiorespiratoire et chez les adultes par le déficit moteur des muscles de la ceinture pelvienne et scapulaire. Le taux de la (GAA) était effondré dans tous les cas. Notre travail a permis d'identifier de nouvelles mutations, non encore rapportées. **Conclusions** : Les résultats de notre étude concordent avec les données de la littérature

Mucopolysaccharidoses

Dr Benmansour,

Pédiatre privé, 35, rue de Mostaganem, Oran, Algérie

Les Mucopolysaccharidoses font partie des maladies lysosomales qui sont des maladies héréditaires rares prises individuellement mais assez fréquentes lorsqu'elles sont prises dans leur ensemble. Elles sont dues à la déficience d'un gène qui a pour résultat l'accumulation de substrat dans les lysosomes de toutes les cellules. Les organes sont tous atteints à des degrés variables Ces maladies font actuellement l'objet d'intenses recherches aussi bien pour le diagnostic que pour le traitement. Les découvertes récentes ont permis pour certaines d'entre elles un accroissement appréciable de la durée de vie. **Méthodes** : Cet exposé permet de faire plus facilement l'approche diagnostique des mucopolysaccharidoses qui semblent relativement fréquentes chez nous en raison de la consanguinité élevée. Nous présentons notre recrutement de 1997 à 2014 qui comprend 67 patients atteints de maladies lysosomales dont la moitié est représentée par des mucopolysaccharidoses. L'iconographie de ces patients comprend les photographies des patients, des tableaux récapitulatifs de la symptomatologie et des radiographies. Tous les patients ont eu une confirmation biologique et ou génétique. Le diagnostic et la prise en charge et les résultats du traitement de ces maladies termine cet exposé.

BRCA1 and BRCA2 mutation spectrum in Algerian breast/ovarian cancer families: current knowledge and implications for genetic analysis

Farid Cherbal1, Rabah Bakour1, Salhi Nadjet1, Chiraz Mehemmai1, Hadjer Gaceb1, Saida Adane2, Kada Boualga3

(1) Unit of Genetics, Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Biological Sciences, University of Sciences and Technology "Houari Boumediene" Algiers, Algeria, (2) Medical Oncology Services, Central Hospital of Algiers, Algeria, (3) Radiation Therapy Services, Anticancer Center of Blida, Algeria

Background: Breast cancer is currently the leading cause of cancer morbidity and mortality among Algerian women. To date, very few reports have been published about the spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in the Algerian population. From 2005 to 2013, we screened BRCA1 and BRCA2 genes in 123 individuals from an Algerian cohort with a personal and family history suggestive of genetic predisposition to breast and/or ovarian cancer. **Methods**: The screening for variants in the breast and ovarian cancer susceptibility genes BRCA1 and BRCA2 in Algerian patients was performed by SSCP and High Resolution Melting (HRM) followed by direct sequencing, or by PCR-direct sequencing, respectively. Samples for which no pathogenic mutation was found were analyzed by MLPA. In silico analyses have been performed using 3 different bioinformatics programs (Align-GVGD, Polymorphism Phenotyping2 and SIFT) to individualize genetics variations that can disrupt the BRCA1 and BRCA2 genes function. **Results**: Three distinct pathogenic mutations c.83_84delTG, c.181T>G, c.798_799delTT and two new large genomic rearrangements (LGRs) involving deletion of exon 2 and exon 8 respectively, were detected in BRCA1 gene of 10 patients

and first relatives. Interestingly, the BRCA1 mutation c.798_799delTT was identified in two unrelated families in this study. Additionally, some reports have detected this mutation in unrelated families from Algeria (2 families), Tunisia (3 families) and Morocco (3 families), respectively. To date, the BRCA1 mutation c.798_799delTT has been firstly detected as recurrent specific mutation in breast cancer patients from Sardinia and Sicily in Italy. As Mediterranean countries share a common history and migration flow history, BRCA1 mutation c.798_799delTT could be a Mediterranean founder mutation. Two pathogenic mutations c.1310_1313delAAGA and c.5722_5723delCT were identified in BRCA2 gene of two unrelated families. No LGRs were detected in BRCA2 gene. Interestingly, the BRCA2 c.1310_1313delAAGA mutation has been detected in one family from Tunisia. In addition, 83 UVs (unclassified variants) and SNPs (single nucleotide polymorphisms) were detected in BRCA1/2 genes (32 BRCA1 and 51 BRCA2), 35 were new UVs (10 BRCA1 and 25 BRCA2), 6 were rare UVs (3 BRCA1 and 3 BRCA2) and 42 were SNPs (19 BRCA1 and 23 BRCA2). Moreover, 9 new missense UVs identified in this study: two BRCA1 (Q1356K and R1634M) and seven BRCA2 (D367N, S879Y, S1013T, C1290S, V1810F, H2116D and G3086R) were predicted to be likely pathogenic in silico. **Conclusions:** The new missense BRCA1 and BRCA2 unclassified variants detected in Algerian population could have a functional role in breast/or ovarian cancer development, which deserves to be explored further. The accumulating knowledge about the prevalence and nature of BRCA1 and BRCA2 mutations in Algerian population and the identification of specific mutations will contribute in the future to the implementation of genetic testing and counseling for Algerian families at risk.

Aspects Moléculaires des Anomalies de la Différenciation Sexuelle

A.Djermane* A.Ladjouze** Y.Ouarezki***

*EPH Gouraya **CHU Bab El Oued***EPSP Baraki

Les anomalies de la différenciation sexuelle recouvrent un large spectre de tableaux cliniques qu'il est fondamental d'identifier quelle que soit la période de leur expression. La différenciation sexuelle est un processus en cascade, le sexe d'un individu se définit en 4 étapes chronologique 1)le sexe génétique (XX ou XY) établi à la fécondation qui impose 2)le sexe gonadique (testicule ou ovaire) à partir d'une gonade bi-potentielle, puis c'est le sexe gonadique qui commande 3) la différenciation des caractères sexuels primaires et secondaires. En règle générale, ces processus aboutissent au fait que les 4 sexes biologiques d'un individu sont du même genre (masculin ou féminin). Cependant, des dérégulations peuvent introduire une discordance entre le genre des différents sexes d'un individu. Ce processus met en jeu des contrôles génétiques, épigénétiques, endocrines, paracrines qui interviennent de façon séquentielle et coordonnée. Depuis une dizaine d'années, les progrès considérables de la génétique et de la biologie moléculaire ont singulièrement contribué à une dissection plus fine des différentes étapes de la différenciation sexuelle normale, base indispensable à l'identification et au management des anomalies de la différenciation sexuelles avec l'identification des gènes clés de la différenciation sexuelle : SRY, SOX9, SF1, WNT1, WNT4... Dans tous les cas, une prise en charge rapide et rationnelle s'impose : elle implique une démarche rigoureuse susceptible d'aboutir au diagnostic étiologique et au choix thérapeutique adéquat. Cette approche doit résulter de l'expérience d'une équipe pluridisciplinaire, au sein de laquelle le pédiatre-endocrinologue, le généticien, le radiologue, le chirurgien pédiatre coordonnent leurs compétences.

APPORT DE LA GENETIQUE AU DIAGNOSTIC DES DIABETES MODY

Z.Bouderda 1; I.Mezhoud2; S.Bicha1; N.Boumaza2; H.Baaziz3; A.Laieb4

(1). Service de pédiatrie B ; CHU Constantine, (2). Service de pédiatrie EPH El Bir Constantine (3). Service de pédiatrie Hopital de Batna. (4). Service de pédiatrie Hopital de Skikda

Les diabètes MODY sont un groupe hétérogène de désordres métaboliques caractérisés par un diabète sucré non cétosique, de transmission autosomique dominante, survenant avant l'âge de 25 ans , parfois dans l'enfance ou l'adolescence et comportant un défaut primaire dans la fonction β cellulaire. Les MODY constituent 2 à 5%

des diabètes non insulino-dépendants et probablement 10% des DT1. Ils ont d'abord été décrits cliniquement puis depuis les années 1990 les gènes les plus fréquents ont été identifiés. Ce sont des diabètes monogéniques. Il existe plusieurs types de diabètes MODY. Les plus connus sont au nombre de 8 . Ils résultent d'une mutation d'un gène qui code pour une enzyme glycolytique (la Glucokinase dans le MODY 2) ou lipolytique (la Carboxyl Ester Lipase dans le MODY 8), ou bien pour un facteur de transcription. Parmi ceux-ci on citera: Hepatocyte Nuclear Factor (HNF) 4A , 1A,1B respectivement associés au MODY 1,3,et 5 Insulin Promotor Factor 1 (IPF1) pour le MODY 4 Neurogenic Differentiation Factor 1 NEUROD1 connu aussi sous la dénomination de β cell E box Transactivator 2 (BETA2) associé au MODY 6 Kruppel like Factor KLF 11 pour le MODY 7. Ces gènes sont tous exprimés dans la cellule β et la mutation de l'un d'entre eux conduit au dysfonctionnement de celle-ci et à un diabète. Ils sont également exprimés dans d'autres cellules : hépatique, rénale, nerveuse. Les formes les plus fréquentes sont représentées par les MODY 2 et 3. L'âge, au début du diabète, peut être précoce comme dans le MODY 2. Les facteurs susceptibles d'altérer la sensibilité à l'insuline comme une infection, la puberté ou l'obésité peuvent faciliter le déclenchement du diabète. L'existence de plusieurs cas familiaux de diabète doit toujours être recherchée et constitue un argument de poids pour évoquer un MODY. Les manifestations cliniques sont variables et vont de l'hyperglycémie modérée à jeun asymptomatique jusqu'aux tableaux rapidement progressifs nécessitant la mise sous insuline. La position de la mutation notamment pour HNF1 A a été corrélée à l'expression clinique et à l'âge de survenue. Les signes extra-pancréatiques comme des kystes rénaux, une insuffisance rénale ou hépatique ont une valeur d'orientation diagnostique. Il en est de même pour le peptide C non effondré et l'abaissement de la CRP plasmatique. Certaines formes comme le MODY 3 peuvent répondre au traitement par les sulfonylurées pendant de longues années. Les complications microvasculaires, exceptionnelles dans les MODY 2 sont fréquentes dans le MODY 3. Le diagnostic moléculaire est indispensable au diagnostic de MODY. De plus il permet d'établir un pronostic, d'adapter le traitement et la surveillance et de proposer un dépistage familial pour un diagnostic précoce. Cependant il reste coûteux et non disponible partout.

Place des allèles HLA DQ2 et DQ8 parmi les critères de diagnostic de la Maladie Cœliaque

Boumaza Nacera; Mezhoud Insaf; Bicha Samia; Bouderda Zahia

La maladie cœliaque est une entéropathie inflammatoire chronique auto-immune, liée à une hypersensibilité au gluten se développant sur un terrain de susceptibilité génétique. Elle est caractérisée par une inflammation de la muqueuse intestinale responsable d'atrophie villositaire totale ou subtotale. La présentation clinique de la maladie cœliaque s'est modifiée ces deux dernières décennies avec apparition à coté de la forme classique typique des formes atypiques mono ou pauci symptomatiques et des formes asymptomatiques ou silencieuses. Selon des études la présence de l'haplotype HLA DR3-DQ2 et DR4-DQ8 est associée à un risque élevé de maladie cœliaque, et il existe une bonne corrélation entre les anticorps positifs pour la maladie cœliaque et les haplotypes HLA DQ2 et DQ8. La Société Européenne de Gastroentérologie, Hépatologie et Nutrition pédiatriques (ESPGHAN) a publié de nouvelles recommandations pour le diagnostic de la maladie cœliaque, qui remplacent celles de 1990 où le diagnostic de la maladie cœliaque repose sur les données de la clinique, de l'anamnèse familiale, des anticorps spécifiques pour la maladie cœliaque, le typage HLA et la biopsie intestinale

Le syndrome de Wolfram, quel gène ?

I. MEZHOUDI, N. BOUMAZA1, S. BICHA1, H. BAAZIZ2, A. LAIEB1, Z. BOUDERDA2.

(1) Service de Pédiatrie. CHU Ibn Badis. Constantine. (2) Service de Pédiatrie. CHU Benflis Touhami. Batna.

Le syndrome de Wolfram ou DIDMOAD, affection génétique rare, très sévère, associant un diabète type 1, un diabète insipide, une atrophie optique, une hypoacousie et éventuellement d'autres manifestations neuro-dégénératives. Il s'agit d'une affection de transmission autosomique récessive, dont la prévalence a été estimée à 1/550000 enfants. 2 gènes en cause ont été identifiés: le WFS1 localisé en

4p16.1, codant pour la Wolframine, protéine trans membranaire localisée dans le reticulum endoplasmique et joue le rôle dans l'homeostasie calcique. Les mutations dans ce gène sont responsables de la majorité des cas. Le WFS2 localisé en 4q22-24, codant pour l'ERIS, dont la mutation n'a été retrouvée que dans 4 familles jordaniennes. Les seuls critères nécessaires au diagnostic sont: un diabète type 1 non auto immun apparaissant généralement avant l'âge de 10 ans et une atrophie optique bilatérale survenant avant la 2^{ème} décennie. L'étude génétique permet le diagnostic prénatal et au stade presymptomatique.

La prise en charge repose sur le dépistage et le traitement des différents troubles associés au SW. La maladie progresse souvent vers un décès précoce en raison de l'insuffisance respiratoire centrale.

Etude des polymorphismes -C/G 1291 et G/A 1780 du gène ADRA2A dans le cancer du sein

Ghania Belaaloui^{1,2}, Batoul Kaabi³, Wassila Benbrahim^{1,4}, Kamel Hamizi^{1,4}, Mourad Sadelaoud⁵, Widad Toumi⁵, Hocine Bounecker^{1,2,6}.
 1Faculté de Medecine. Université Hadj Lakhdar. Batna. 2 Laboratoire GRIAS. Université Hadj Lakhdar. Batna. 3 Faculté des Sciences. Université Hadj Lakhdar. Batna. 4 Centre anti-Cancer. Batna. 5 Laboratoire LAM. Batna. 6 Service d'épidémiologie. CHU Benflis Touhami. Batna.

Introduction : Le pronostic du cancer du sein (CS) est classiquement dicté par la classification clinico-anatomo-pathologique (TNM), l'expression des récepteurs hormonaux et HER2, ou les mutations génétiques comme celles de BRCA1 et BRCA2, qui ne sont cependant pas toujours fiables. Le récepteur adrénérique alpha2A participe à la régulation cardiovasculaire et respiratoire. Deux SNP de son gène ADRA2A: rs1800544 (C-1291G) et rs553668 (G1780A) ont été associés à l'obésité et au diabète type 2, eux mêmes étant des facteurs de risque et de pronostic du CS. L'objectif de ce travail est de vérifier, pour la première fois, l'hypothèse de l'association de ces SNP avec le pronostic du CS. **Patientes et méthodes :** Chez 100 cas prévalents de CS à Batna, l'ADN génomique a été extrait du sang périphérique sur colonnes de silice (Qiagen) et le génotypage a été réalisé par PCR en temps réel (Rotor-Gene). Caractéristiques anatomopathologiques, grade histologique et expression de marqueurs de surface, ont été obtenus des dossiers médicaux. Les tests (Chi2 et Fisher) ont été utilisés avec un seuil de significativité de 0.05. **Résultats :** L'âge moyen des patientes a été de 48.28±1.04 ans. Les fréquences génotypiques ont été de 35.7% (CC), 41.8% (GC) et 22,4% (GG) pour le rs1800544, et de 60.2% (GG), 30.6% (AG) et 9,2% (AA) pour le rs553668. La population était en équilibre de Hardy-Weinberg pour les deux SNP. L'allèle G du rs1800544 a été associé aux stades TNM avancés III-IV (OR=2.8, p=0.02), et son génotype GC génotype a été associé au grade SBR3 (OR=4.64, p=0.03). Bien que son génotype GG génotype semble être associé au statut pré-ménopausique, ceci n'a pas atteint le seuil de significativité (OR=3.21, p=0.05). Par ailleurs, nous n'avons pas trouvé d'association entre le rs553668 et les indicateurs de pronostic, mais il existait une association significative entre son génotype AA et le statut pré-ménopausique des patientes (OR=17.19, p=0.008). Nous avons trouvé des signes indirects d'une éventuelle association entre les deux SNP étudiés et le risque de CS: les fréquences des allèles mineurs sont différentes de ce qui a été décrit chez des personnes en bonne santé; ceci pourrait s'expliquer soit par l'appartenance ethnique ou bien par l'état de santé. **Conclusions :** Ceci est la première investigation du polymorphisme du gène ADRA2A dans le pronostic du CS. Le rs1800544 est associé aux stades TNM/SBR de mauvais pronostic, tandis que le rs553668 est associé au statut pré-ménopausique. Le rôle du polymorphisme du gène ADRA2A dans le pronostic du CS nécessite une étude plus vaste, et son éventuelle association avec la susceptibilité au CS est en cours d'étude.

Obésités et syndromes génétiques chez l'enfant.

S Bicha I Mezhoud N Boumaaza H Baaziz Z Bouderdar

L'obésité secondaire est une obésité massive qui survient chez les sujets présentant des syndromes génétiques. Le syndrome Willi Prader (WP) est une anomalie sur le chromosome 15 dont 70% des cas est une délétion 15 q11q 13 ou une disomie maternelle de cette région, le syndrome de Laurence Moon Bardet Biedel (LMBB),à transmission autosomique récessive est confirmé par l'identification de trois gènes candidats localisés respectivement sur les chromosomes 3,16 et 15. Leur prévalence est estimée de 1/10000 à 1/30000 (WP) et de 1/100000 (LMBB) enfants par naissances. Le taux de prévalence de l'obésité génétique est majoré dans les régions où la consanguinité est élevée , elle est souvent associée à des perturbations importantes des facteurs cardiométaboliques prédisposants les enfants au diabète type 2 et aux maladies cardiovasculaires d'où l'intérêt d'un conseil génétique et d'une prise en charge multidisciplinaire.

Etude du profil des mutations du gène KRAS dans le cancer colorectal à Batna

I Amrani¹, G Belaaloui^{1,3}, W Benbrahim^{1,2}, D Aissaoui^{1,2}

¹Faculté de Médecine. Université de Batna 2. ²Centre anti-Cancer de Batna. ³Laboratoire de recherche universitaire GRIAS.

Introduction : Le Cetuximab et le Panitumumab sont des anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur de l'EGF (EGFR), utilisés dans le cancer colorectal (CCR) métastatique. L'EGFR promeut la prolifération cellulaire, l'inhibition de la mort cellulaire et l'invasion tumorale, via la signalisation à travers la protéine KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog). Les mutations somatiques du gène de cette protéine (KRAS), répondent rarement au traitement par inhibiteurs de l'EGFR. La recherche de ces mutations permet donc de rationaliser l'utilisation des inhibiteurs de l'EGFR, en augmentant leur chance d'être efficaces et en épargnant les malades de leurs effets secondaires, sans oublier la réduction du coût de la prise en charge des malades. **Méthodes:** Dans cette étude nous avons présenté une analyse rétrospective des types de mutations du gène KRAS et de leurs fréquences chez des patients atteints de CCR traités au niveau du centre anti-cancer (CAC) de Batna, durant la période s'étendant de janvier 2011 à octobre 2014. Nous avons également présenté une analyse de la corrélation de ces types de mutations et de leurs localisations avec les données démographiques et anatomo-cliniques des patients. **Résultats et discussion :** Sur les 377 cas de CCR traités au niveau du CAC Batna, les données du génotypage et d'anatomopathologie étaient disponibles pour seulement 65 patients. Le génotypage montrait un gène KRAS muté chez 21 (32%) patients. Le type de mutation le plus fréquent est le c.35 G>A (p.G12D) représentant 38% de la totalité des mutations détectées. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature. Les mutations du gène KRAS étaient significativement associées à l'aspect non infiltrant de la tumeur (p= 0.02). Aucune association n'a été trouvée entre le statut tumoral et les autres facteurs démographiques et anatomopathologiques. **Conclusion :** En ce basant sur les résultats de la présente étude, la prévalence du génotype muté du gène KRAS ainsi que le type de mutation prédominant dans notre population sont superposables à ceux observés dans d'autres populations. Le seul facteur associé au génotype muté du gène KRAS dans notre population est l'aspect non infiltrant de la tumeur. Cependant, des études plus vastes sont nécessaires pour confirmer ou réfuter ces résultats.

Ce recueil des abstracts a été publié dans le « *Batna Journal of Medical Sciences* » **BJMS**, l'organe officiel de « *l'association de la Recherche Pharmaceutique – Batna* »

Le contenu de la Revue est ouvert « Open Access » et permet au lecteur de télécharger, d'utiliser le contenu dans un but personnel ou d'enseignement, sans demander l'autorisation de l'éditeur/auteur.

Pour plus d'informations, contacter BatnaJMS@gmail.com ou connectez-vous sur le site de la revue : www.batnajms.com



RÉSUMÉ

La maladie de Crohn (MC) fait partie des maladies inflammatoires chroniques cryptogénétiques de l'intestin qui sont des affections multifactorielles, résultants de la combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. L'incidence de la maladie a augmenté au cours de ces 20 dernières années.

L'objectif de notre étude était de préciser les caractéristiques démographiques, topographiques, phénotypiques et d'examiner d'éventuelles associations entre les mutations du gène *CARD15/NOD2* et la MC.

Méthodes : Notre étude, portant sur 144 témoins et 103 malades atteints de la MC recrutés entre CHU Constantine et CHU Batna, colligés sur une période de 39 mois (2011-2014). Le génotypage des polymorphismes du gène *CARD15/NOD2* est déterminé par la technique de PCR-RFLP.

Résultats : L'âge moyen global de nos malades est de $33,05 \pm 12,10$ ans avec des extrêmes allant de 15 à 67 ans et un pic de fréquence entre 20 et 30 ans. La quasi-totalité de nos malades est d'origine urbaine. 33,98% des patients sont issus d'un mariage consanguin, 28,1 % ont un antécédent familial de MICI.

La localisation iléo-colique est la plus fréquente (41,47 %). Elle prédomine chez les sujets jeunes et ne présente pas de différence entre les deux sexes. Par ailleurs la localisation colique est caractéristique des patients d'âge avancé et plus fréquente chez les hommes. Les phénotypes inflammatoires, fistulisant et sténosant touchent les sujets les plus jeunes (22,3 %, 19,5 % et 58,2 % respectivement).

Dans notre étude, les trois polymorphismes sont représentés avec des fréquences génotypiques variables. La fréquence de l'allèle muté de chacun de ces polymorphismes est plus importante chez les patients par rapport aux témoins (R702W : 1,46% vs. 0,35%, G908R : 5,83% vs. 3,5% et 1007fs : 4,85% vs. 1,04%).

Dans notre échantillonnage, les mutations du gène *CARD15/NOD2* sont corrélées à une localisation iléo-colique, une présentation sténosante ainsi qu'à une évolution plus sévère de la maladie par l'apparition des signes extra-digestifs.

Conclusion : L'étude génétique avait révélé une association significative entre le polymorphisme R702W et 1007fs du gène *CARD15/NOD2* et la MC. Le contexte génétique semble avoir une part importante dans la physiopathologie de la MC dans la population algérienne vue la fréquence élevée des antécédents familiaux et des mutations du gène *CARD15/NOD2*.

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

ABSTRACT

Crohn's disease (CD) is one of cryptogenic chronic inflammatory diseases of the intestine that represents multifactorial affection, resulting from a combination of genetic and environmental factors. The incidence of CD has increased over the last 20 years; Africa is considered a low-incidence area.

The objective of our study was to determine the demographic, topographic and phenotypic characteristics and to investigate possible associations between mutations of *CARD15 / NOD2* gene and CD in the Algerian population.

Methods: Our study involving 144 controls and 103 patients with CD recruited from CHU of Constantine and CHU of Batna, collected over a period of 39 months (2011-2014). Genotypes of polymorphisms of The *CARD15/NOD2* gene were studied by PCR -RFLP technique.

Results: The overall mean age of patients was 33.05 ± 12.10 years, ranging from 15 to 67 years with a peak incidence ranged between 20 and 30 years. Almost all of our patients are of urban origin. 33.98% are issue from a consanguineous marriage, 28.1 % have a family history of MICI. The ileocolon localization is the most frequent (41.47 %). It is predominant among young people and it doesn't differ between both sexes. While the colonic localization is characteristic of advanced age patients and is more common in men. Inflammatory phenotypes, penetrating and stricturing, affect younger patients (22.3%, 19.5 % and 58.2 % respectively).

In our study, the three polymorphisms of *CARD 15/NOD 2* gene are represented with varying genotype frequencies. The frequencies of the mutated alleles are higher in patients compared to controls (R702W : 1,46% vs. 0,35%, G908R : 5,83% vs. 3,5% et 1007fs : 4,85% vs. 1,04%).

In our sample, the mutations correlate with ileocolon localization, stricturing presentation and a more severe evolution of the disease by the appearance of extra- intestinal symptoms.

Conclusion: The genetic study revealed a significant association between the R702W and 1007fs polymorphisms of the *CARD15 / NOD2* gene and the CD. The genetic background seems to have an important role in the pathophysiology of CD in the Algerian population because of the high frequency of family history and *NOD2 / CARD15* gene mutations.

Keywords: Crohn's Disease, *CARD15 / NOD2*, Genotype - phenotype, PCR-RFLP

ملخص

يعتبر مرض كرون أحد أنواع الأمراض الإلتهابية المزمنة للأمعاء، وهي أمراض مجهولة السبب وتنتج عن مزيج من العوامل الوراثية والبيئية. أثناء العقدين الماضيين لوحظت زيادة في معدل الإصابة بمرض كرون.

الهدف: من هذه الدراسة هو تحديد النمط الديموغرافي، الطوبوغرافي، المظهري والوراثي حيث تمت دراسة المورثة *CARD15 /NOD2* بتقنية PCR-RFLP .

الطرق: لأجل استخلاص مميزات هذا المرض قمنا بجمع 144 شاهدا و 103 مريضا بمرض كرون من المستشفى الجامعي لمدينتي قسنطينة و باتنة في فترة زمنية تقدر ب 39 شهر (2011-2014) .

النتائج: بعد دراسة جميع الحالات المرضية تحصلنا على عمر متوسط يقدر ما بين 15 و 67 سنة، حيث تكون ذروة الإصابة بهذا المرض ما بين 20 و 30 سنة و معظمهم أصولهم حضرية (المدن). و قد أحصينا كذلك 33,98% حالة من ذوي الزواج بالأقرباء و 28,1% لديهم تاريخ عائلي من حالات الإصابة بمرض التهاب الأمعاء المزمن .

تحصلنا على نسبة عالية (41,47%) من المرضى المصابين بمرض كرون في منطقة القولون اللفائفي، حيث أن أغلبيتهم من الشباب و من الجنسين ، في حين أن إصابة القولون يتميز بها الكهول من الرجال.

التهابات الظواهر المتمثلة في الناسور، التضيق والالتهابات التي تصيب المرضى الأصغر سنا، تمثل على التوالي 19.5 %، 58.2% و 22.3%.

خلال دراستنا لاحظنا وجود الطفرات الثلاثة بترددات مختلف، حيث أن تردد الأليل الطافر أكبر نسبة عند المرضى مقارنة بالأصحاء (1007fs: 1,04% vs. 4,85% :G908R, 3,5% vs. 5,83% :R702W, 0,35% vs. 1,46%) .
تحصلنا في عينتنا المدروسة على أن الطفرات تكون مرتبطة بتموقع الالتهاب في منطقة القولون اللفائفي، كما أنها مرتبطة بشدة المرض و تطوره و يتمثل ذلك بظهور أعراض خارج الجهاز الهضمي.

الخلاصة: كشفت الدراسة الوراثية عن جود علاقة وثيقة بين تعدد الأشكال R702W و fs1007 للمورثة *NOD2* /*CARD15* و مرض كرون ،حيث يبدو أن الخلفية الوراثية لها دور مهم في الفيزيولوجيا المرضية لمرض كرون خاصة مع وجود تردد عالي للحالات التي لها تاريخ عائلي و تردد طفرات المورثة *CARD15/ NOD2* .

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

