

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Blida-1-



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie et physiologie cellulaire

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Spécialité : Génétique et physiologie

Thème :

*Analyse croisée des allèles HLA DR-DQ et des
auto-anticorps dans la maladie cœliaque*

Réalisé par :

M^{elle} SADOUN Fella & *M^{elle} CHEIFA Fatima Zohra*

Devant le jury composé de

<i>M^{me} CHEKHMA A</i>	<i>MAA</i>	<i>USDB1</i>	<i>Présidente</i>
<i>M^{me} BENAZOUZ F.</i>	<i>MAA</i>	<i>USDB1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>P^r MEDDOUR Y.</i>	<i>MCA</i>	<i>HCA</i>	<i>Promoteur</i>
<i>M^r BESSAAD A.</i>	<i>MCB</i>	<i>USDB1</i>	<i>Co-promoteur</i>

Promotion 2017-2018

Résumé

La maladie cœliaque est une entéropathie inflammatoire auto-immune chronique induite par l'ingestion de gluten chez des sujets génétiquement prédisposés. Le facteur génétique prédisposant principal de cette maladie est le système HLA.

Dans ce travail, nous avons étudié la susceptibilité génétique de la maladie cœliaque et rechercher une éventuelle association entre les allèles HLA DR-DQ et les auto-anticorps retrouvés dans cette maladie.

Nous avons réalisé une étude perspective sur 36 patients atteints de maladie cœliaque.

Nos résultats montrent que les femmes sont plus touchées que les hommes avec un pourcentage (72,2%) contre (27,8%). Le sexe ratio 2,6.

Les résultats obtenus montrent que (77,77 %) portent un phénotype DQ2 et/ou DQ8. Ce à démontre l'importance de ces deux molécules dans la pathologie. Ainsi que la majorité de nos patients présentent l'allèle HLA DR17 (30,46%). Ceci démontre que la susceptibilité à la MC est conférée par l'haplotype HLA DR17/DQ2.

Toute fois sur la totalité des patient positifs en HLA-DQ2, seuls 17 ont une sérologie positive pour les auto-anticorps anti- transglutaminas (tTG (+) car les autres n'ont pas encore développé la maladie, ils sont considérés comme prédisposés génétiquement à la développer.

Les mots clés : maladie cœliaque, gluten, système HLA, HLA DRB1, HLADQB1, anticorps anti-transglutaminase (tTG).

Summary

Celiac disease (CD) is a chronic autoimmune inflammatory enteropathy induced by ingestion of gluten in genetically predisposed individuals. The main predisposing factor in this disease is the HLA system.

In this work, we studied the genetic susceptibility of (CD) and look for possible association between HLA DR-DQ alleles and autoantibodies found in this disease.

We performed a study perspective of 36 patients with (CD).

Our results show that women are more affected than men with a percentage (72,2%) versus (27,8%). The sex ratio (2.7).

The results obtained show that (77.77%) carry a phenotype DQ2 and/or DQ8. This demonstrates the importance of these two molecules in the pathology. As well as the majority of our patients present the HLA DR17 allele. This demonstrates that the susceptibility to CD is conferred by the HLA DR17-DQ2 haplotype.

However, in all HLA-DQ2 positive patients, only 17 have positive serology for anti-transglutaminase autoantibodies (tTG (+)) because the others have not yet developed the disease, they are considered to be genetically predisposed to develop it.

Keywords: celiac disease, gluten, HLA system, HLA DRB1, HLADQB1,

anti-transglutaminase antibody (tTG).

Remerciements

Tout travail réussi dans la vie nécessite en premier lieu la bénédiction de Dieu.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements et notre profonde gratitude à tous ceux qui nous ont encouragé et soutenu tout au long de la réalisation de ce travail, en particulier ...

Notre promoteur **Pr MEDDOUR, Y.** de nous avoir accueillies au sein de laboratoire d'immunologie de l'hôpital central de l'armée (HCA), proposé ce thème et, accepté de nous encadrer durant notre stage de fin d'étude ; pour ses explications, ses conseils, son aide et, tous les moyens nécessaires mis à notre disposition pour effectuer notre stage dans les meilleures conditions.

Nous tenons également à exprimer notre reconnaissance ainsi que nos vifs et sincères remerciements à notre Co-promoteur **Mr BESSAAD, A.** pour le temps et l'effort qu'il nous a consacrés pour réaliser ce travail et, son aide et ses conseils afin d'améliorer la qualité de ce mémoire.

Nous exprimons notre profonde gratitude à **Mme CHEKHMA, A.** de nous avoir fait l'honneur de présider le jury.

Nous remercions vivement **Mme BENAZOUZ, F.** d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail que nous vous soumettons avec plaisir et d'avoir l'honneur d'apporter ses jugements scientifiques, merci.

Nous remercions également toute l'équipe du laboratoire d'immunologie de l'hôpital central de l'armée, pour leur aide et bonne entente durant toute la période du stage.

A la fin nous adressons nos sincères remerciements à l'ensemble des enseignants du département de Biologie et physiologie cellulaire, qui nous ont prodigué une formation solide et de qualité.



Dédicaces

Louange à DIEU, seigneur de l'univers, le tout puissant et miséricordieux, qui ma inspirer et comblé de bienfaits, je lui rends grâce.

A ceux qui ont toujours dévoué et sacrifier pour moi : ceux qui m'ont aidé du mieux qu'ils pouvaient pour réussir : ceux qui m'ont accompagné tout au long de ce parcours : ceux qui ont toujours été là dans mes moment de détresse,

Mes très chers parents,

A mes sœurs et mes frères,

A tout ma famille,

A tous mes amis,

A mon binôme Fella,

A toute la promotion Génétique et physiologie cellulaire 2016/2017,

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Fatima Zohra. CH

Dédicaces

Louange à DIEU, seigneur de l'univers, le tout puissant et miséricordieux, qui ma inspirer et comblé de bienfaits, je lui rends grâce.

A ceux qui ont toujours dévoué et sacrifier pour moi : ceux qui m'ont aidé du mieux qu'ils pouvaient pour réussir : ceux qui m'ont accompagné tout au long de ce parcours : ceux qui ont toujours été là dans mes moment de détresse,

Mes très chers parents,

A mes sœurs et mes frères,

A tout ma famille,

A tous mes amis,

A mon binôme Fatima Zohra,

A toute la promotion Génétique et physiologie cellulaire 2016/2017,

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Fella .S

Liste Des Abréviations

AC : Anticorps

AA^tTG : Anticorps Anti-transglutaminase

ADN : Acide Désoxyribonucléique

BET : Bromure d'Ethidium

CAS : Cartridges

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EMA : Anticorps Anti-Endomysium

EDB : Elution Dilution Buffer

HLA : Human Leucocyte Antigène

IL : Interleukine

INF : Interféron

LB : Lymphocytes B

LDB : Lysis Dilution Buffer

LIE : Lymphocyte Intraépithélial

LT : lymphocyte T

MC : Maladie Cœliaque

MEC : Matrice Extracellulaire

MMP : Métalloprotéase Matricielle

Nk : Natural Killer

OR : Odds Ratio

PCR-SSP : Polymérase Chain Réaction –Spécifique Séquence Primers

TAE : Tris Acétate EDTA

TCR : Cell Receptor des lymphocytes T

Th : Lymphocyte T helper

tTG : Transglutaminase tissulaire

UV : Ultraviolet

WDB : Wash Dilution Buffer

WTS : Waste Tube

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
Chapitre I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Généralité	2
1.1. Définition.....	2
1.2. Historique	2
1.3. Epidémiologie.....	4
2. Aspects cliniques.....	5
2.1. Formes de la maladie coeliaque.....	5
2.2. Caractéristique clinique.....	7
3. Physiopathologie.....	8
3.1. Facteurs génétique.....	8
3.2. Facteur environnementaux	11
3.3. Facteur de dérégulation immunitaire.....	12
4. Diagnostic.....	14
4.1. Recherche des auto-anticorps.....	14
4.2. Typage HLA DR-DQ.....	16
4.2. Diagnostic histologique	16
Chapitre II : MATERIEL ET METHODE	
1. Population étudiée.....	19
2. Méthodes.....	19
2.1. Typage générique HLA de classe II DR, DQ	19
2.1.1. Extraction de l'ADN g.....	19
2.1.2. Technique de typage par (PCR-SSP).....	22
2.1.3. Révélation des amplifications par électrophorèses sur gel d'agarose.....	24
2.2. Le dosage des auto-anticorps anti-transglutaminase par technique d'ELISA.....	26
3. Tests statistique.....	28
Chapitre III : RESULTATS	
1. Caractéristiques démographique.....	29
1.1. Répartition des patients selon le sexe.....	29
1.2. Répartition des patients selon l'age.....	30
1.3. Répartition des patients selon le signe clinique.....	30

2. Fréquence des allèles HLA DRB1- DQB1.....	31
2.1. Fréquence des phénotypes HLA DQB1.....	31
2.2. Fréquence des allèles HLA DQB1*.....	32
2.3. Fréquence des allèles HLA DRB1*	33
2.4. Fréquence de l'homozygotie et de l'hétérozygotie des allèles HLA DQB1*.....	34
2.5. Fréquence des haplotypes HLA DRB1*-DQB1*.....	35
3. Résultats de la recherche des auto-anticorps.....	36
3.1. Fréquence des anticorps anti-transglutaminase (IgA).....	36
4. Etude croisée des allèles HLA DQB1* en fonction des auto-anticorps (TGt).....	36
4.1. Fréquence des allèles HLA DQB1* en fonction des auto-anticorps (TGt).....	36
4.2. Fréquence des allèles HLA DRB1* en fonction des auto-anticorps (TGt).....	37
4.3. Fréquence de l'homozygotie et de l'hétérozygotie des allèles HLA DQB1* en fonction des auto-anticorps (TGt).....	37
4.4. Fréquence des haplotypes HLA DRB1*-DQB1* en fonction des auto-anticorps (TGt).....	38

Chapitre V : DISCUSSION

1. Discussion.....	39
--------------------	----

CONCLUSION	45
-------------------------	----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	46
---	----

ANNEXE

Liste des figures

-Figure 1 : Carte indiquant la fréquence de la maladie cœliaque selon les pays.....	4
- Figure 2 : organisation des gènes HLA sur le chromosome 6.....	9
- Figure 3 : L'association de la molécule HLA classe II à M.....	10
- Figure 4 : Les complexes CMH classe II-peptide de gluten.....	10
- Figure 5 : hypothèse de physiopathologique.....	12
- Figure 6 : La pathogenèse de la maladie cœliaque.....	13
- Figure 7 : Les principales étapes de la réaction de PCR.....	22
- Figure 8 : Répartition des patients selon le sexe.....	29
- Figure 9 : répartition des patients selon l'âge.....	30
- Figure 10 : Répartition des patients selon les signes cliniques.....	30
- Figure 11 : Fréquence phénotypique des allèles DQB1.....	31
- Figure 12 : Fréquence des allèles HLA DQB1*.....	32
- Figure 13 : Fréquence des allèles HLA DRB1*.....	33
- Figure 14:Fréquence de l'homozygotie et de l'hétérozygotie des allèles HLA DQB1*.....	34
- Figure 15 : Fréquence des haplotypes HLA DRB1*-DQB1*.....	35
- Figure 16 : Fréquence des anticorps anti-transglutaminase.....	36
- Figure 17 : Fréquence des allèles HLA DQB1* en fonction des auto-anticorps (TGt).....	36
- Figure 18 : Fréquence des allèles HLA DRB1* en fonction AAtTG.....	37
- Figure 18 : Fréquence de l'homozygotie et de l'hétérozygotie des allèles HLA DQB1* en fonction AAtTG.....	37
- Figure 19 : La fréquence des haplotypes HLA DRB1*-DQB1* en fonction AAtTG.....	38

Liste des tableaux

- Tableau I : Importantes réalisations historiques dans l'étude de la pathologie de la MC.....	3
- Tableau II : Prévalence de la MC dans quelques wilayas de l'est Algérien.....	5
- Tableau III : Caractéristiques cliniques dans la maladie cœliaque.....	7
- Tableau IV : Auto-anticorps et MC.....	14
- Tableaux V : Classification de Marsh-Oberhuber de maladie cœliaque.....	17
- Tableau VI : caractéristiques générales des patients et sujets témoins.....	19
- Tableau VII : Mélange réactionnel pour la PCR.....	23
- Tableau VIII : programme PCR.....	24
- Tableau IX : Fréquence phénotypique des allèles HLA DQB1.....	Annexe2
- Tableau X : Fréquence des allèles HLA DQB*.....	Annexe2
- Tableau XI : Fréquence des allèles HLA DRB1*.....	Annexe2
- Tableau XII : Fréquence de l'homozygotie et de l'hétérozygotie des allèles HLA DQB1*	Annexe2
- Tableau XIII : Fréquences des haplotypes HLA DRB1*-DQB1*.....	Annexe2
- Tableau XIV : Fréquence des anticorps anti-transglutaminase.....	Annexe2
- Tableau XV : Fréquence des allèles HLA DQB1* en fonction AAtTG	Annexe2
- Tableau XVI : Fréquence des allèles HLA DRB1* en fonction AAtTG.....	Annexe2
- Tableau XVII : La fréquence de l'homozygotie et de l'hétérozygotie des allèles HLA DQB1* en fonction AAtTG.....	Annexe2
- Tableau XVIII : La fréquence des haplotypes HLA DRB1*-DQB1* en fonction AAtTG.....	Annexe2

INTRODUCTION

Environ 1 sur 100 personnes ne peut pas manger des éléments de base parce qu'elles souffrent d'une maladie appelée maladie cœliaque (MC). La MC est une entéropathie auto-immune induite par l'exposition au gluten chez les individus génétiquement prédisposés.

Dans cette maladie, Les auto-anticorps jouent un rôle important dans la pathogénie de la MC. Les peptides de la gliadine subissent une désamidation grâce à une enzyme intracellulaire ubiquitaire la transglutaminase tissulaire (tTG). La reconnaissance par le système immunitaire de la transglutaminase complexée à la gliadine entraîne la production d'auto-anticorps anti-transglutaminase (AtTG) et anti-gliadines (AAG).

Le gluten est le principal facteur déclencheur de la maladie en combinaison avec les molécules HLA-DQ2 et/ou DQ8. Ces molécules sont codées par les gènes HLA-DQA1 et HLA-DQB1, qui sont les principaux facteurs de risque génétiques pour la MC.

L'objectif de ce travail d'étudier, la susceptibilité génétique de la maladie cœliaque et chercher une éventuelle association entre les allèles HLA DRDQ en fonction des auto-anticorps, et de voir à quel point l'analyse moléculaire du HLA est important dans le diagnostic et l'association des différents marqueurs dans la MC.

Nous avons pour cela utilisé deux techniques complémentaire pour confirmer l'atteinte de la MC, une technique de typage générique par la réaction de polymérisation en chaîne par amorces spécifiques des séquences (PCR-SSP) pour étude génétique et une technique de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) pour étude sérologique des auto-anticorps anti transglutaminase. Cette étude a été réalisée sur un échantillon de (36) patients algérien atteints de la maladie cœliaque, en comparaison à une population de 73 sujets sains.

INTRODUCTION

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

OBJECTIF DU TRAVAIL

MATERIEL ET METHODES

RESULTATS

DISCUSSION

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

CONCLUSION

Au terme de notre étude sur l'analyse croisée des allèles HLA DR DQ et des auto-anticorps dans la maladie cœliaque nous pouvons conclure que :

1. la maladie cœliaque n'est pas une maladie infantile, la prévalence de l'âge est en effet élargie avec une prédominance féminine.
2. La forte association de MC avec certaines maladie auto-immunes tel que le diabète de type 1 et la maladie des thyroïdites auto-immune.
3. Les résultats de notre étude nous permettent de confirmer l'association entre les gènes HLA de classe II et la maladie cœliaque dans l'échantillon étudié de population Algérienne.
4. Les patients positifs en auto-anticorps transglutaminas expriment des allèles HLA DQ2 et HLA DQ8.
5. L'association de la maladie avec l'allèle DR17 n'est que le fait du déséquilibre de liaison avec l'allèle DQ2,

Il serait plus intéressant d'effectuer une étude sur le territoire national avec un effectif beaucoup plus important afin d'avoir plus de données concernant la distribution des allèles dans la maladie cœliaque et leur association avec les auto-anticorps

Les connaissances acquises concernant les molécules HLA permettant d'utiliser le génotypage HLA DQB1 dans la stratégie diagnostic associée avec le dosage des anticorps anti-transglutaminase.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- [1]. Boutaleb,A,F,(2015), Maladies cœliaque de l'adulte former atypique et extra-intestinales. Thèse de Doctorat en sciences médicales, université d'Alger Benyoucef Benkhedda, Alger.pp:5
- [2].Gujral,N.,Freeman,H,J,&Thomson,A,B,(2012),Celiacdiseaseprevalence,diagnosis,pathology genesis and treatment,world journal of gastroenterology; WJG,18(42).6036.
- [3].Ciccocioppo,R,Kryzliak,P.,Cangemi,G,C.,Pohanka,M,Betti,E.,Lauret.,& Rodrigo,L (2015).the spectrum of differences between childhood and adulthood celiac disease,Nutrients,7(10),8733-8751
- [4].Maud pinier, 2010.une nouvelle stratégies de traitement de la maladie cœliaque base sur les polymères séquestrant .thèse de Doctorat en sciences pharmaceutique, université de sciences pharmaceutiques Monreal, pp:1
- [5]. Bouasla.A,(2011),prévalence de la maladie cœliaque à Constantine (1996_2008)et diététique associée auprès des patients de LEHS sidi mabrouk de Constantine (2009) Menaire de Magister en sciences Alimentaires , université de nutrition de l'alimentation et des technologies Agro-Alimentaires MENTouri _constantine,(I.N.A.T.A.A),Algie .pp:3
- [6].Gardini,E.(2013),_Intolrance au gluten de l'enfant Revue française d'Allergologie . 53(3) ,331-333.
- [7].Olives, J.P.(2006) Maladie Coeliaques : nouvelles pec ties , Médecine in tane , 31(6),428_433
- [8].Noel R.,Rose, IAN R, Mackay, 2014 the AutoImmune Diseases . typest by MPS Limited,Chennai _India, Printed and bound in the united States of America.
- [9]. Malamut ,G,E,O,R,G,I,A,& C.'2010).Maladie Cœliaque , Revue de Médecine in terne,31(6),428_433
- [10].Lamireau,T,& Clouzeau,H.(2013),Epidémiologie de la maladie coeliaque ,pathologie Biologie,61(2),e1-e4
- [11].Lionetti,E,Gatti,S,Pulvireni,A,& Catassi,C,(2015), Celiac disease from aglobal persective,Best practice & recherché clinical gastroenterology 29(3),365-379

- [12].Catassi,C,Gatti,S,& Lionetti,E,(2015),World perspective and celiac disease epidemiology,Digestive diseases,33(2),241-146
- [13].Catassi,C,(2014), Journal from Health care professionals 03-2014
- [14]. Boudraa,G., Bessahraoui, M., Bouzeane, k., Niar, S., Naceur ,M., Bouchutara, A., Benmensour, A., Touhami, M. (2008). Evolution de l'incidence de la maladie coeliaque chez l'enfant de l'Est Algérien (1975-2007).titre de la revue ; 13 :949
- [15].Nion-Larmurier ,J,Cosnes,(2009),maladie coeliaque,Gastroenterologie Clinique et Biologique 33-508-517
- [16].Olives,J,P,(2013),la maladie coeliaque ,post'U,13,20
- [17].Mouterder,O,Dumant,C,& Malle +,E.(2013),Les manifestations de la maladie Coeliaque chez l' enfant . pathosg : e . o log :e,61 (3) ,e53 _e55
- [18].Richhaid .I. (2007) ,la Maladie . coeliaque :du Diagnostic à la prise en charge . these de Doctora d'état universite de Nantes faculte de pharmace pp
- [19]. WEBER,A,L, (2012),la Maladie coeliaque :physio_pathologie et Traitement <<Gide<< de conseils pour le pharmacien D'offien ,these d'Etat de Doctorat eu pharmacie , université de Lorraine pp :
- [20].Lepers,S,Couignoux ,S, Solodulte , J.F. & Dubucquoi ,S, (2004). La maladie Coeliaque de l' adulte : aspects nouredux la Revue . de medicine interne , 25 (1) .22 _ 34
- [21]. Rostom ,A. Murray ,J,A,& Kagnoff ,M, F (2006) American gastroenterological association (AGA) institut technical review on the diagnosis and management of celiac disease castroenterology 131(G) 1981-2002
- [22]. Ranpertats S.D.pooram .N. brar P Singh P & green P.H(2006) trend in the presentation of celiac disease the American journal of medicine 119(4),355-e9
- [23]. Kerfal .A.(2012) . prof :lEp : demi o log : que et prise eu charge de la maladie coeliaque de l' adulte a l' hopitale Mohaned v de Meknes (Apropose de 93 cas) . these de Doctorate u Medecine , un : versit sidi Morammed Beu A Bellah , alge , pp
- [24]. Kelly,C,P,B,A,J,C,LIIU, E,&leffler .D.A (2015) Advances in diagnosis and managment of celiac disease cast coenerology ,148(6),1175,1186

- [25]. Cherief .F.N.H.(2012) facteurs génétiques de predisposition a la Maladie . coeliaque et l'oesophagite Eosinophilique ,memoire presente à la faculte des etudes superieures en vue de l'obtention du grade de Maitrise en microbiologie et immunologie . université de Montreal pp
- [26] . A. Cesbron Gautier, K. Gagne, C. Retière, A. Devys, J.-D. Bignon Le, (2007), Système HLA , Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés. 13-000-M-53.
- [27]. Labalette,M., Siamak Bahram, Marie Christine Béné, Le complexe majeur d'histocompatibilité humain (HLA).Polymorphisme et présentation des antigènes aux lymphocytes T
- [28] . Dr MILOUDI/HMRUC, Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- [29].Bousquet,A,(2015),la maladie coeliaque du diagnostic a sa prise en charge : un nouvel espoir thérapeutique ,these de Doctorat d'Etat en pharmacie,universite Toulouse 3 Paul Sabatier:pp
- [30].Meresse, B., Malamut, G., & Cerf-Bensussan, N. (2012). Celiac disease: an immunological jigsaw. *Immunity*, 36(6), 907-919.
- [31].Bousquet, A. (2015). La maladie cœliaque, du diagnostic à sa prise en charge: un nouvel espoir thérapeutique? (Doctoral dissertation).
- [32] . Ashok Sharma¹, Xiang Liu², David Hadley^{2,3}, William Hagopian⁴, Edwin Liu⁵, Wei-Min Chen⁶, Suna Onengut-Gumuscu⁶, Ville Simell⁷, Marian Rewers⁸, Anette-G. Ziegler⁹, Åke Lernmark¹⁰, Olli Simell⁷, Jorma Toppari⁷, Jeffrey P. Krischer², Beena Akolkar¹¹, Stephen S. Rich⁶, Daniel Agardh¹², Jin-Xiong She^{1*}, TEDDY Study Group(2016), Identification of Non-HLA Genes Associated with Celiac Disease and Country-Specific Differences in a Large, International Pediatric Cohort,*Plos one*,11(3),e0152476.
- [33]. Benjamin Lebwohl, Jonas F Ludvigsson, professor, Peter H R Green, (2015). Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity, PMCID: PMC4596973
- [34]. E. M. Tkoub,(2008), Maladie coeliaque de l'adulte Adult celiac disease, *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 48 (2008) S27-S31

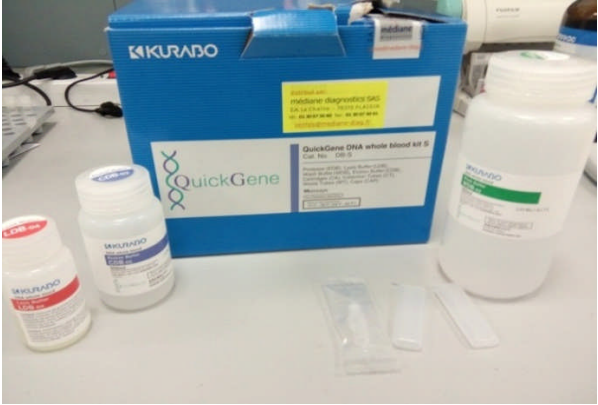

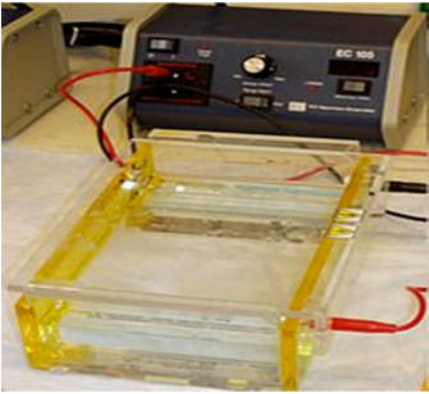
- [35]. Chyderiotis, G, Emmanuel, C, Fabien, N, Capucine, L, Lucile MUSSET, Nils-Olivier OLSSON, Bach-Nga PHAMEuropean Autoimmunity Standardization Initiative (EASI) groupe France Maladie coeliaque : la place des autoanticorps dans le diagnostic et le suivi, (2008)
- [36]. Malamut, G, Mersse, Collier, C, & Cerf Bensussan, N, (2009), La maladie coeliaque en 2009: un futur sans régime? *Gastroentérologie Clinique et biologique*, 33(8), 635-647
- [37]. Cerf-Bensussan, N, Jabri, B, (2001), La maladie coeliaque : une maladie auto-immune induite par un antigène alimentaire, *MIS, médecine/sciences* 2001 ; 17 : 1129-38
- [38]. Koning F, Schuppan D, Cerf-Bensussan N, Sollid LM. Pathomechanisms in celiac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005;19:373-87.
- [39]. Sollid LM, Molberg O, McAdam S, Lundin KE. Autoantibodies in celiac disease: tissue transglutaminase –guilt by association? *Gut* 1997;41:851-2.
- [40]. Koning F, Schuppan D, Cerf-Bensussan N, Sollid LM. Pathomechanisms in celiac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005;19:373-7.
- [41]. Sollid LM. Celiac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* 2002;2:647-55.
- [42]. Di Sabatino A, Corazza GR. Celiac disease. *Lancet* 2009;373: 1480-93.
- [43]. P. Chrétien (2011), Autoanticorps dans la maladie coeliaque, *Biologie médicale EMC*, 90-30-0100-A
- [44]. Schuppan D, Zimmer KP: The diagnosis and treatment of celiac disease. *Dtsch Arztebl Int* 2013; 110(49): 835–46. DOI: 10.3238/arztebl.2013.0835
- [45]. B. Admoua, M. Sbihi b, F. Bienvenu, L. Chabaaa, (2009), Diagnostic immunologique de la maladie coeliaque chez l'enfant. Mise au point Immunologic diagnosis of celiac disease in children. *Report progress, Immuno-analyse et biologie spécialisée* (2009) 24, 217—222
- [46]. J.-P. Olivesa, T. Lamireaub, F. Ruemmelec, d, pour le Groupe francophone d'hépatologie gastroentérologie et nutrition pédiatrique (GFHGNP), (2013), Nouvelles recommandations européennes pour le diagnostic de la maladie cœliaque chez l'enfant : une réelle simplification ? *Archives de Pédiatrie* 2014;21:241-244

- [47]., Julio C. Bai , Fried,M ,Gino ,R Corazza , Schuppan,D , Farthing,M , Catassi,C, Greco,L , Cohen,H , Ciacci,C , Fasano,A , González,A, Justus H. Krabshuis ,A, LeMair ,J-Jacques Gonvers,(2012), Maladie coeliaque, World Gastroenterology Organisation Global Guidelines, WGO Global Guidelines Celiac disease (long version
- [48]. Lebwohl,B, Rubio-Tapia,A, , Guandalini,S,Catherine Newland, Asaad Assiri,(2012), Diagnosis of Celiac Disease, *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2012 October ; 22(4): 661–677. doi:10.1016/j.giec.2012.07.004
- [49].Farchi,O,Rogeu,S, A.-S. DELEPLANCQUE,M. LABALETTE, S,DUBUCQUOI, (2016)Le point sur la sérologie de la maladie coeliaque, feuillets IMMUNOLOGIE Maladie coeliaque,,de Biologie/N° 330 - MAI 2016
- [50]. Mohsin,R,(2016), Tests sérologiques dans la maladie coeliaque, *Le Médecin de famille canadien*,62:e11-e17
- [51]. Bossuyt,X,(2014), Le diagnostic de la maladie coeliaque au laboratoire :recommandations actuelles, *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - JUILLET/AOUT 2014- N°464*
- [52]. Lorena P. Rios MD Aliya Khan MD Muhammad Sultan MD Karen McAssey MD Mona A. Fouda MB BS David Armstrong MB BChir,(2013), *Le Médecin de famille canadien*, 59:e441-8
- [53].Rampertab.,D,Gerard.,E , Mullin.Celiac disease,2014, INBN 978-14614-8560-5
- [54]. Moalic,V,(2008), Comment est réalisé un typage HLA ?, journal homepage,Réanimation (2008) 17, 407—411
- [55].Anser Ahmed S.,yong P.R.,Penhal W.d (1986) :beneficial effect of testosterone in the traitement chronic auto immune thyroiditis in rats , these .*J.Immunolo.*,136.14-143.
- [56].Mayer A,Orgiazzi,T.F.(2003) :Bases physiopathologie auto-immunité thyroïdienne humaine ,la throidite scientifique et médicale ,Eds Elsever,244-232
- [57].Schmitz J and Garnier-Lengliné H. Celiac disease diagnosis in 2008. *Sciencedirect*, Volume 15, Issue 4, April 2008, Pages 446-455.
- [58]. Lepers S, Couignoux S, Colombel JF, Dubucquoi S. La maladie coeliaque de l'adulte : aspects nouveaux. *Rev Med Interne* 2004 ; 25 (1) : 22-34.

- [59]. Gjertsen H.A., Sollid L.M., Thorsby E., Lundin K.E.A. (1994): T cells from the peripheral of celiac disease patients recognize gluten antigens when presented by HLA-DR, DQ or-DP molecules *Scand, J. Immunol.* 39, 567-574
- [60]. Miliani M., 2013, polymorphisme génétique des allèles HLA DR DQ dans la maladie cœliaque, mémoire de Master en science de la nature et de la vie, université Saad Dahlab Blida
- [61]. Djender et Lounici 2010. polymorphisme des gènes HLA dans la maladie cœliaque, mémoire de Master en science de la nature et de la vie, université lunis Mohamed Alger
- [62]. Boudjemaa A. (2005): contribution de l'implication des gènes HLA de classe II dans la survenue de maladies auto-immunes: la maladie cœliaque, l'association diabète de type 1- maladie cœliaque dans la population de l'ouest algérien et la polyarthrite rhumatoïde dans la population française, Thèse de Biologie Moléculaire et génétique, USTO?oran
- [63]. Trynka G, Hunt K.A., Bockett, N.A., Romanos J, Mistry V, Szperl A, Bakker SF, Bardella MT, Bhaw-Rosun L, Castillejo G, de la Concha EG, de Almeida RC. et al. (2011): Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease, *Nat Genet* 43:1193-1201
- [64]. Sollid L.M., Markussen G.E.K., Gjerde H, Vantdal F., Thorsby E (1989). Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer, *J Exp Med*, 169:345-81
- [65]. Laadhar L., Tourin A., Kallel-Sellami M., Zitouni M., Bouraoui S., Maherzi A., Makni S., Ben Hariz M. (2009) : HLA class II polymorphisme in children with coeliac disease in Tunisia : is there any influence on clinical manifestation ? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 11 :1286-90
- [66]. Lachaux, A. (2006). Les formes cliniques trompeuses de la maladie cœliaque. *Archives de pédiatrie*, 13(6), 572-574.
- [67]. Qiao, S. W., Bergseng, E., Molberg, Ø., Jung, G., Fleckenstein, B., & Sollid, L. M. (2005). Refining the rules of gliadin T cell epitope binding to the disease-associated DQ2 molecule in celiac disease: importance of proline spacing and glutamine deamidation. *The Journal of Immunology*, 175(1), 254-261.

- [68]. Clerget-Darpoux F. (1994) : High risk genotypes for celiac disease C R. Acad Sci Paris life Sci :317 :931-936.
- [69]. Karel, K., Louka, A. S., Moodie, S. J., Ascher, H., Clot, F., Greco, L., ... & European Genetics Cluster on Celiac Disease. (2009). HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Human immunology*, 64(4), 469-477.
- [70]. Baudon, J., Louka AS, Moodie SJ, et al. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*025DQ2) heterodimer : results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol*; 64:469-477 (2001).
- [71]. Di Niro R, Mesin L, Zheng NY, et al. High abundance of plasma cells secreting transglutaminase 2-specific IgA autoantibodies with limited somatic hypermutation in celiac disease intestinal lesions. *Nat Med*; 18:441–445 (2012).
- [72]. Caja S, Myrsky E, Korponay-Szabo IR, et al. Inhibition of transglutaminase 2 enzymatic activity ameliorates the anti-angiogenic effects of celiac disease autoantibodies. *Scand J Gastroenterol*; 45:421–427 (2010).
- [73] Myrsky E, Kaukinen K, Syrjanen M, Korponay-Szabo IR, Maki M, Lindfors K. Coeliac disease specific autoantibodies targeted against transglutaminase 2 disturb angiogenesis. *Clin Exp Immunol*; 152:111–119 (2008).
- [74]. Catassi C., Doloretta M., Ratsech IM, et al. (2001): The distribution of DQ genes in the Sahrawi population provides only partial explanation for the high celiac disease prevalence. *Tissue Antigens* 58:402-406

(ANNEXE 1)

<p><u>Composants de kit « Quick gene »</u></p> <ul style="list-style-type: none">-Protéase PK...30μl-Tampon de lyse (LDB)...250μl-Tampon de lavage(WDB)...750μl-Tampon d'éluion(CDB)...250μl-Cartouche(CAS) « colonne » avec une membrane ultra-fine-Collection des tubes-Eppendorf-tubes de déchets	
<p><u>Le thermocycleur</u> (Applied Biosystems 9700)</p>	
<p><u>Electrophorèse sur gel d'agarose</u></p>	

capture de photo
(GEL DOC XR Biorad)

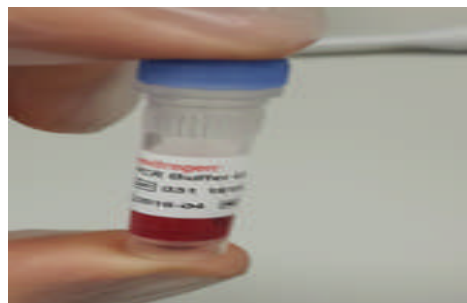


La taq polymérase

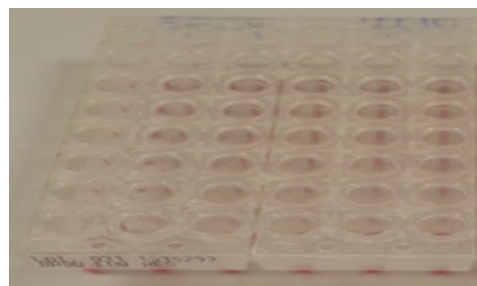


Le mélange réactionnel contient :

- 304 μ l d'eau distillée,
- 230 μ l de tampon PCR,
- 62,5 μ l d'ADN génomique,
- 3,5 μ l de taq polymérase.



Plaque PCR à 32 puis



Tampon Tris Acétate EDTA (TAE)

- en mélangeant 242 gr de tris base et 57,1 ml d'acide acétique et 100 ml d'EDTA.

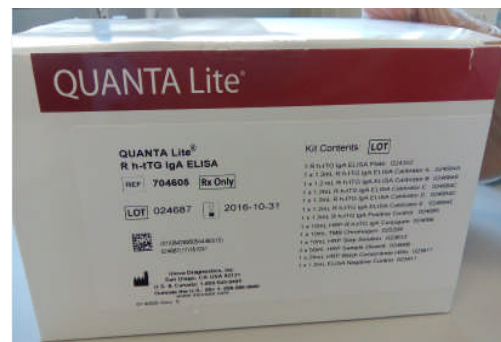
-Ce mélange est ajouté à 1000 ml d'eau distillée.

-Le PH de la préparation est ajusté à 8,0 en utilisant des pastilles de KOH ou NaOH.

-La solution obtenue est concentré 50X. Elle est donc diluée la solution afin d'obtenir une solution concentré 1X



Coffret de tTG IgA ELISA



Puits de microplaque :

Coatés avec les antigènes : 12 barrettes de Microplaque contenant 8 puits sécables sur leur



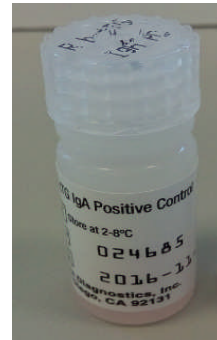
Calibrateur :

6 calibrateurs anticorps anti tTG(IgA) à des concentrations de 0-3-7-16-40-100 U/ml dans PBS contenant de la BSA, de l'azide de sodium 0,095% (p/v) du détergent et fu sérum humain 1,5 ml chacun,prêts à l'emploi



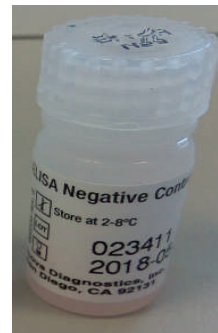
Contrôle positif :

Tampon contenant de la BSA de l'azide de sodium 0,095% (p/v), du détergent et du sérum humain 1,5 ml,prêt à l'emploi



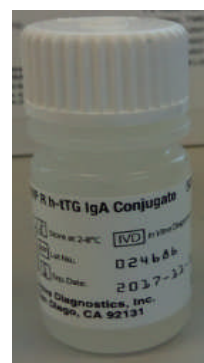
Contrôle négatif :

Tampon contenant de la BSA de l'azide de sodium 0,095% (p/v), du détergent et du sérum humain, 1,5 ml prêt à l'emploi



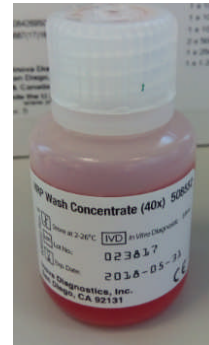
Conjugué enzymatique :

Conjugué anticorps anti-IgG humains HRP (peroxydase du raifort), 20 ml (coloré en rouge), prêts à l'emploi, NEPAS CONGELER



Tampon de lavage (PBS) concentré :

Tampon concentré 20X contenant de l'azide de sodium 0,095% (p/v) et du détergent 75 ml



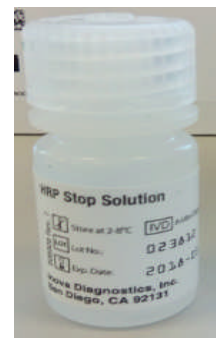
Solution de substrat :

Substrat TMB contient (3, 3', 5,5' tétraméthylbenzidine) ,20 ml, prêts à l'emploi



Solution l'arrêt :

Solution contenant H2SO4, 0,5 M, 20 ml prêt à l'emploi



(ANNEXE 2)

Tableau IX : Fréquence phénotypique des allèles HLA DQB1

Phénotype	" Patients " n=36 Nbr/Fréquence%	"Témoins" n=73 Nbr/Fréquence%	Odds Ratio (OR) et IC à 95%	P	X2
DQ2	25 / 69,4	41,1	3,258 [1,356-7,417]	2,7.10 ⁻³	7,75
DQ8	8 / 22,2	13,7	1,8 [0,616-4,747]	0,129	1,27
DQ2/DQ8 négatif	8 / 22,2	45,21	0,346 [0,142-0,83]	9,9. 10 ⁻³	5,43

Tableau X : Fréquence des allèles HLA DQB*

HLA DQB1* générique	"patients"2n=72 Nbr/Fréquence%	"Témoins"2n=146 Nbr/Fréquence%	Odds Ratio (OR) et IC à 95%	P	X2
DQ5 (1)	22 / 15,28	24 / 16,44	2,24[0,87-5,73]	4,47.10 ⁻²	2,89
DQ6 (1)	10 / 6,94	34 / 23,29	0,3[0,08-1,1]	2,89.10 ⁻²	3,60
DQ2	66 / 45,83	36 / 24,66	6,94[2,86-16,86]	<0,0001	20,25
DQ7 (3)	20 / 13,89	23 / 15,75	1,61[0,58-4,44]	0,18	0,86
DQ8 (3)	18 / 12,5	12 / 8,22	3,19[1,01-10,05]	1,99.10 ⁻²	4,22
DQ9 (3)	0	8 / 05,48	0,21[0,01-4,04]	0,20	2,04
DQ4	2 / 1,39	9 / 06,16	0,39[0,04-3,46]	0,35	0,77
DQ3	6 / 4,17	0	15,36[0,77-306,0]	3,4.10 ⁻²	6,26

Tableau XI : Fréquence des allèles HLA DRB1*

HLA DRB1* générique	"patients"2n=72 Nbr/Fréquence%	"Témoins"2n=146 Nbr/Fréquence%	Odds Ratio (OR) et IC à 95%	P	X2
DR1	6 / 8,33	15 / 10,27	0,857 [0,229-3,45]	0,42	4,56. 10 ⁻²
DR15 (2)	3 / 4,17	14 / 09,59	0,269 [0,023-1,629]	9,9.10 ⁻²	1,65
DR16 (2)	2 / 2,78	0	∞ [0,225- ∞]	0,33	2,05
DR17 (3)	22 / 30,46	22 / 15,07	2,48 [0,924-6,687]	2,5.10 ⁻²	3,59
DR18 (3)	1 / 1,39	6 / 04,11	0,667 [0,050-4,624]	0,598	0,12
DR3	3 / 4,17	0	∞ [0,225- ∞]	0,33	2,05
DR4	8 / 11,11	26 / 17,81	0,577 [0,194-1,747]	0,182	0,82
DR11 (5)	3 / 18,06	15 / 10,27	1,886 [0,548-5,712]	0,142	1,15
DR13 (6)	4 / 5,56	23 / 15,75	0,332 [0,071-1,554]	7,4. 10 ⁻²	2,08
DR7	8 / 11,11	13 / 08,9	0,635 [0,211-1,982]	0,229	0,55
DR9	1 / 1,39	6 / 04,11	0,667 [0,050-4,624]	0,598	0,12
DR10	1 / 1,39	6 / 04,11	0,667 [0,050-4,624]	0,598	0,12

Tableau XII : Fréquence de l'homozygotie et de l'hétérozygotie des allèles HLA DQB1*

Génotypes	"patients" n=36 Nbr/Fréquence%	"Témoins" n=73 Nbr/Fréquence%	Odds Ratio (OR) et IC à 95%	P	X2
DQ2/DQ2	8 / 22,22	4 / 6,84	4,929 [1,51-15,42]	4,3.10 ⁻³	6,90
DQ2/DQ8	5 / 13,89	1 / 1,37	11,61 [1,44-138,3]	3,5.10 ⁻³	7,26
DQ2/DQX	12 / 33,33	24 / 32,88	1,021 [0,460-2,304]	0,48	2,27. 10 ⁻³
DQ8/DQ8	1 / 1,39	1 / 1,37	2,057 [0,106-39,55]	0,55	0,27
DQ8/DQX	2 / 2,78	9 / 12,33	0,299 [0,064-1,35]	0,09	2,55

Tableau XIII : Fréquences des haplotypes HLA DRB1*-DQB1*

Haplotypes	"patients" n=36 Nbr/Fréquence%	"Témoins" n=73 Nbr/Fréquence%	Odds Ratio (OR) et IC à 95%	P	X2
DR17(3)-DQ2	15 / 41,67	9 / 13,7	5,079 [2,016-12,73]	3.10 ⁻⁴	12,09
DR7-DQ2	6 / 16,67	4 / 5,48	3,45 [0,942-11,32]	2,85.10 ⁻²	3,62
DR4-DQ8	4 / 11,11	5 / 6,85	1,7 [0,492-6,232]	0,224	0,58

Tableau XIV : Fréquence des anticorps anti-transglutaminase

des anticorps anti-transglutaminase	Fréquence (%) "patients" n= 36	Fréquence (%) "Témoins"n=73	Odds Ratio(OR) et IC à 95%	P	X2
Positif	17(47,22%)	0(0%)	131,9[7,59-2294]	<0,001	40,84
Négatif	19(52,78%)	73(100%)	7,6.10 ⁻³ [4,36.10 ⁻⁴ -0,13]	<0,001	40,84

Tableau XV : Fréquence des allèles HLA DQB1* en fonction AAtTG

HLA DQB1* générique	Nombre des patients	Pourcentages
DQ2	16	94,12
DQ5	6	35,29
DQ8	4	23,52
DQ6	1	5,88
DQ3	1	5,88
DQ7	1	5,88

Tableau XVI : Fréquence des allèles HLA DRB1* en fonction AAtTG

HLA DRB1* générique	Nombre des patients	Pourcentages
DR17	12	70,59
DR4	4	23,53
DR13	3	17,65
DR11	3	17,65
DR7	3	17,65
DR1	2	11,76
DR3	1	5,88
DR18	1	5,88
DR9	1	5,88
DR15	1	5,88
DR10	1	5,88

**Tableau XVII : La fréquence de l'homozygotie et de l'hétérozygotie des allèles
HLA DQB1* en fonction AAtTG**

Génotypes	Nombre des patients	Pourcentages
DQ2/DQ2	5	29,41
DQ2/DQ8	3	17,65
DQ7/DQ8	1	5,88
DQ2/DQ5	6	35,29
DQ2/DQ3	1	5,88
DQ2/DQ6	1	5,88

Tableau XVII : La fréquence des haplotypes HLA DRB1*-DQB1* en fonction AAtTG

Haplotypes	Nombre des patients	Pourcentages
DR17(3)-DQ2	12	70,59
DR7-DQ2	3	17,65
DR4-DQ8	2	11,76

1. Généralité

1.1. Définition

La maladie cœliaque est définie selon la Société Européenne de Pédiatrie, Gastroentérologie, Hépatologie, et Nutrition, comme une entéropathie auto-immune secondaire à l'ingestion de gluten, chez des sujets prédisposés génétiquement [1].

Les personnes atteintes de MC peuvent présenter des symptômes gastro-intestinaux, des symptômes extra-intestinaux ou aucun signe [2].

Les symptômes classiques comprennent des diarrhées, des stéatorrhées et une perte de poids due à la malabsorption [2].

Environ 50% des patients atteints d'une maladie cœliaque présentent des symptômes extra-intestinaux, comme l'anémie, l'ostéoporose, la dermatite herpétiforme, des problèmes neurologiques et dentaires hypoplasie de l'émail [2].

En outre, la MC est associée à plusieurs maladies auto - immunes, principalement diabète sucré de type 1 et la thyroïdite [3].

1.2. Historique

L'évolution des traditions agricoles apporte des réponses sur l'histoire de la maladie. Les premières céréales cultivées, il y a 10 000 ans au niveau du croissant fertile, furent des espèces sauvages de froment (*Triticum dicocoides*) et d'orge (*Hordeum spontaneum*). La sélection d'espèces plus ou moins immunotoxiques pour l'homme a été engendrée depuis l'avènement de l'agriculture au néolithique [4].

Le médecin Anglais Samuel Gee est souvent crédité en tant que premier auteur décrivant la maladie cœliaque dans son article célèbre « On the Celiac Affection » publié dans « the St. Bartholomew's Hospital Report » en 1888. Cependant, au 2ème siècle avant JC, le médecin romain ARETAUES DE CAPPADOCE a pu décrire la maladie cœliaque [5].

Et c'est au début des années 1950 que le rôle délétère du gluten a été montré. Les premières biopsies de la muqueuse intestinale ont permis la description des lésions histologiques caractéristiques de la maladie cœliaque [6].

Au cours des années 1980 et 1990, plusieurs tests biologiques de dépistage, mesurant des anticorps sériques anti-gliadine, anti-réticuline et anti-endomysium (EMA), ont permis de

mieux préciser la fréquence de la maladie, sous-estimée, et les formes particulières de la maladie, notamment extra-digestives. Enfin, en 1997, la découverte des auto-anticorps anti-transglutaminase (TGA) tissulaire a été une véritable révolution [6].

Les premières études génétiques dans les familles des sujets atteints ont permis de soupçonner une susceptibilité génétique. Celle-ci a été confirmée grâce à l'avènement de la biologie moléculaire qui a mis en évidence l'association primitive avec un antigène du système d'histocompatibilité situé sur la région HLA-DQ2 [7].

Tableau I : Importantes réalisations historiques dans l'étude de la pathologie de la maladie cœliaque [8].

Réalisations historiques importantes dans l'étude de la pathogenèse des maladies cœliaques

- Première description d'une affection semblable à la maladie cœliaque par Aethuse de Cappadocien (deuxième siècle après JC)
- Première description précise du désordre (Gee, 1888)
- Suggestion que le régime de bananes peut guérir la maladie (Haas, 1932)
- Le gluten de blé identifié comme un agent causal (Dicke, 1950)
- L'atrophie de Villeuse et l'hyperplasie de crypte se révèlent pathognomoniques pour la maladie (Paulley, 1954)
- Maladie cœliaque de l'enfance et de l'adulte sans fil partagent la même pathogenèse (Rubin et al., 1960)
- Groupement familial de la maladie cœliaque éprouvée par biopsie (MacDonald et al., 1965)
- Premiers critères diagnostiques de la maladie cœliaque pédiatrique de ESPGAN (Meeuwisse, 1970)
- La maladie coeliaque était un trouble associé à HLA (Falchuk et al., 1972, Stokes et al., 1972)
- Existence d'autoanticorps contre la réticuline détectée (Alp et Wright, 1971; Seah et al., 1971)
- Immunité à la gliadine à médiation cellulaire dans la maladie coeliaque spécimens de biopsie intestinale (Ferguson et al., 1975)
- HLA-DQ2 heterodimer (DQA1 * 05 / DQB1 * 02) identifié comme le facteur de susceptibilité HLA primaire (Sollid et al., 1989)
- Isolation de cellules T spécifiques à la gliadine, HLA-DQ2-limitées à partir de biopsies intestinales (Lundin et al., 1993)
- Autoanticorps de la maladie coeliaque identifié comme transglutaminase (Dieterich et al., 1997)
- Rôle du TG2 pour rendre les peptides gluten plus immunogènes par reconnaissance de de'amidation (Molberg et al., 1998; van de Wal et al., 1998a)

1.3. Epidémiologie

La fréquence de la MC a longtemps été sous-estimée, en raison des formes silencieuses, pauci-symptomatiques ou atypiques qui sont actuellement majoritaires [9].

La prévalence, proportion de sujets atteints de la maladie cœliaque dans une population a un moment donnée, dépend des critères diagnostiques utilisés [10].

La maladie cœliaque est l'une des affections les plus fréquentes au cours de la vie dans les pays peuplés d'individus d'origine européenne, touchant environ 1% de la population générale [11].

Des études séro-épidémiologiques récentes font état d'une prévalence d'environ 1% en Europe et aux USA [9].

La MC est un trouble commun en Afrique du Nord, au Moyen-Orient et en Inde ; Cependant, le taux de diagnostic est faible dans ces pays en raison de la faible disponibilité des moyens de diagnostic et de la sensibilisation aux maladies. La prévalence la plus élevée de MC au monde (5,6%) a été décrite dans une population africaine originaire du Sahara Occidental, sahraouie, d'origine arabe berbère [12].

Les raisons de cette fréquence MC élevée ne sont pas claires, mais pourraient être principalement liées à des changements alimentaires récents et à des facteurs génétiques, étant donné le niveau élevé de consanguinité de cette population [12].

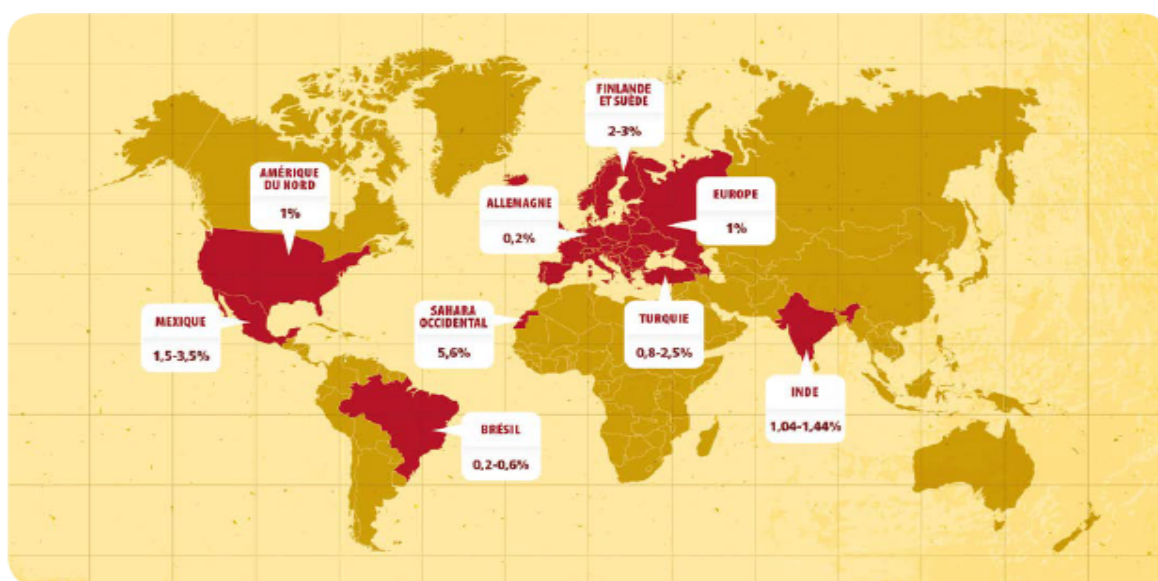


Figure1 : Carte indiquant la fréquence de la maladie cœliaque selon les pays [13].

En Algérie dans une étude oranaise, le taux d'enfants cœliaques atteint les 16,4 % chez les enfants diabétiques [1].

En Tunisie la prévalence chez les donneurs de sang est de 1/157 à 1/179 [1].

Tableau II : Prévalence de la maladie cœliaque dans quelques wilayas de l'est Algérien
[14].

Willaya	Prévalence%
Guelma	1.04
Khenchla	0.88
Mila	1.07

La MC est deux à trois fois plus fréquente chez la femme et affecte essentiellement les sujets caucasiens [15].

Les deux pics de fréquence sont la petite enfance, le plus souvent entre six mois et deux ans, le gluten étant introduit dans l'alimentation habituellement à la fin de la première année et l'adulte jeune entre 20 et 40 ans. Environ deux tiers des maladies cœliaques sont découvertes dans l'enfance et un tiers à l'âge adulte [15].

L'incidence, le nombre de nouveaux cas par an rapportés à la population, de la maladie cœliaque a augmenté de façon importante durant les 30 dernières années, passant de 2-3 à 9, voire 13, nouveaux cas pour 100 000 habitants et par an [10].

Cette augmentation d'incidence avec le temps reflète, probablement, une reconnaissance des formes atypiques et silencieuses grâce aux tests sérologiques. Des différences de prévalence de gènes de prédisposition et des modalités de la diversification alimentaire (introduction plus précoce ou plus tardive du gluten) pourraient également expliquer des variations géographiques et dans le temps de l'incidence de la maladie [16].

2. Aspects cliniques :

2.1. Forme de la maladie cœliaque

La maladie cœliaque est caractérisée par une atrophie villositaire prédominant sur l'intestin grêle proximal, à l'origine de manifestations cliniques de deux types :

Des signes digestifs associant une diarrhée, qui peut alterner avec des épisodes de constipation, un amaigrissement, des douleurs abdominales ou encore une dyspepsie [18].

Des signes extradigestifs consécutifs à la malabsorption, avec de nombreuses perturbations métaboliques comme un retard de croissance chez l'enfant, une ostéoporose, une asthénie, des crises de tétanie, une anémie ferriprive, des troubles de la coagulation [18].

Ces différents signes cliniques peuvent être isolés et d'intensité variable. Ainsi en fonction des variations des manifestations cliniques, les intolérances au gluten peuvent être classées en différentes formes :

❖ **Formes classiques**

Les formes classiques sont les mieux connues et les plus rapidement diagnostiquées. La forme typique débute après six mois de vie, quelques semaines après l'introduction du gluten. L'enfant souffre de diarrhées chroniques avec syndrome de malabsorption [17]. L'abdomen se distend et augmente de volume. On observe des troubles du comportement : l'enfant est pâle, triste, apathique, irritable et prend du retard dans son développement [19].

❖ **formes atypiques ou pauci-symptomatiques**

Elles représentent la majorité des patients diagnostiqués chez l'adulte, soit plus de 50% des cas [20].

Le diagnostic de MC peut être évoqué devant des symptômes digestifs mineurs ou des symptômes extra-digestifs [18].

❖ **formes asymptomatiques ou silencieuses**

On observe des lésions histologiques propres à la maladie et des anticorps anti-endomysium ou transglutaminase, alors que le sujet ne présente aucun symptôme ou simplement une anémie ferriprive [19].

❖ **formes latentes**

Ce sont des sujets asymptomatiques ayant des anticorps circulants associés à la maladie cœliaque, présentant une hyper lymphocytose intra-épithéliale sur les biopsies duodénales. Ces sujets pourraient développer une authentique maladie cœliaque lors de l'exposition prolongée au gluten [20].

❖ Les formes réfractaires

MC ne répond pas à un régime sans gluten et sont sujets pour développer une duodéno-jéjuno-iléite ulcéralive ou des lymphomes [21].

2.2. Caractéristiques cliniques

La maladie cœliaque est progressivement passée du statut de maladie digestive rare du nourrisson à celui de maladie systémique fréquente touchant toutes les catégories d'âge [22].

Les manifestations cliniques révélant la maladie cœliaque ont changé de profil au cours de ces 20 dernières années [23].

Aujourd'hui, Ces manifestations peuvent être classiques (malabsorption, y compris diarrhée, stéatorrhée, perte de poids ou défaillance de croissance) ou non classiques et symptomatiques (gastro-intestinaux et / ou extra-intestinaux évidents) ou asymptomatiques [24].

Tableau III : Caractéristiques cliniques dans la maladie cœliaque [24].

Symptômes intestinaux	Signes Extra-intestinaux	Conditions associées
-Diarrhée chronique	-Déficience en fer	-Antécédents familiaux de MC
-Douleur abdominale chronique	-Autres états de carence (vitamine B12, vitamine D, acide folique, zinc, vitamine B6.	-Diabète de type 1
-Malabsorption	-Fatigue	-Thyroïdite auto-immune
-Gonflement	-Stomatite aphteuse récurrente	-Maladie auto-immune du foie
-Une habitude intestinale erratique	-Transaminases hépatiques élevées	-Déficit sélectif en IgA
-Constipation (plus fréquemment chez les enfants)	-Petite taille	-Syndrome de Sjögren
-Anorexie	-Retardé puberté / ménarche	-Syndrome de Down
-Vomissement	-Aménorrhée	-Syndrome de Turner
	-La ménopause précoce	-Syndrome de Williams
	-Dermatite herpétiforme	
	-Ostéopénie / ostéoporose	
	-Hypoplasie de l'émail dentaire	
	-Neuropathie périphérique	
	-Hyposplénisme	

3. Physiopathologie

MC est une pathologie multifactorielle. Sa survenue dépend obligatoirement de l'exposition orale au gluten, mais aussi de facteurs complémentaires comme la prédisposition génétique, de facteurs infectieux mal connus ou de l'introduction trop précoce du gluten dans l'alimentation [19].

3.1. Facteurs génétique

3.1.1. Le complexe majeur d'histocompatibilité

Le complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme occupe une région de 4 à 5 mégabases sur le bras court du chromosome 6, Les gènes les plus importants codent des molécules dites human leukocyte antigens (HLA) qui sont extrêmement polymorphes dans les populations humaines [26].

Les gènes HLA classiques codent pour les molécules qui assurent la fonction de présentation de l'antigène et l'histocompatibilité. Le complexe est subdivisé en 3 régions qui contiennent chacune de nombreux autres gènes avec ou sans fonction immunologique [27].

La région CMH de classe I comprend 3 gènes HLA de classe I dits "classiques", HLA-A, HLA-B, HLA-C. La région CMH de classe II comprend 3 paires de gènes HLA de classe II dits "classiques", HLA-DP (gènes DPA et DPB), HLA-DQ (DQA et DQB) et HLA-DR (DRA et DRB1) [27].

Située entre les régions I et II, la région III ne renferme pas de gènes intervenant dans la présentation antigénique. Elle contient des gènes codant pour des protéines du système du complément (C2, C4, facteur B), pour le TNF et pour les lymphotoxines. Il existe enfin des antigènes HLA dits « non classiques », de classe I ou de classe II, présentant une structure proche, plus ou moins polymorphes, pouvant être impliqués dans certaines étapes des réponses immunitaires [27].

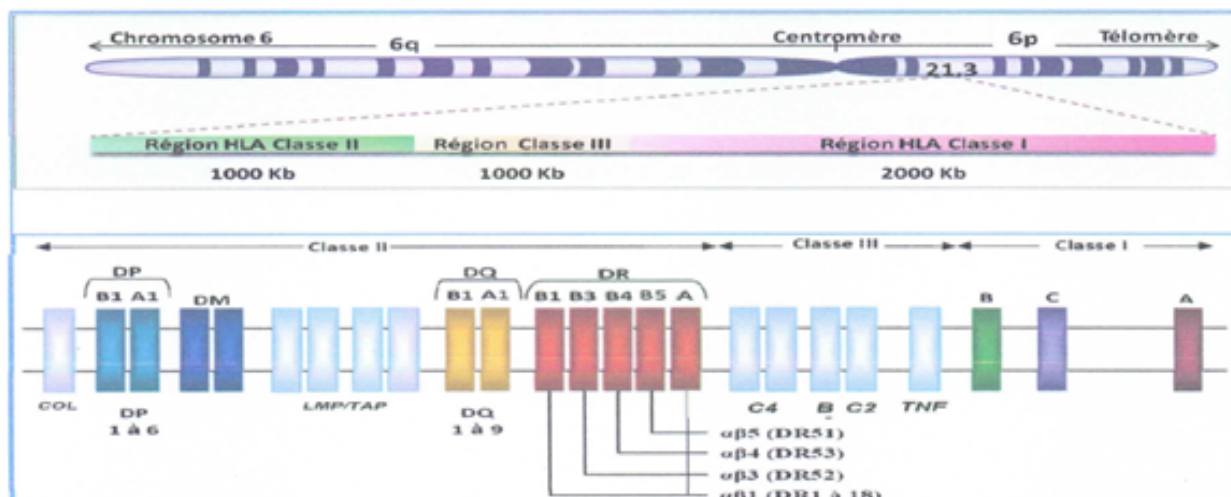


Figure 2 : organisation des gènes HLA sur le chromosome 6 [28].

3.1.2. Association HLA et MC

Habituellement, 90% ou plus des patients atteints de maladie cœliaque portent la molécule HLA DQ2 appelé DQ2.5 Cette molécule se retrouve généralement chez les individus avec l'haplotype DR3-DQ2 codé par les allèles DQA1 * 05: 01 et DQB1 * 02: 01) qui sont situés sur le même chromosome (position cis). Alternativement, il peut être exprimée par les individus qui sont hétérozygotes DQ5DQ7 // DR7DQ2 et ensuite les allèles (DQA1 * 05: 05 et DQB1 * 02: 02) sont situés sur des chromosomes opposés (trans position) [8].

Environ la moitié des patients cœliaques HLA-DQ8 codé par le DQA1 * 03 et le DQB1 * 03: 02 Allèles. Le reste des patients est DQ2.2 ou DQ7.5 [8].

HLA-DQ2 et HLA-DQ8 jouent un rôle clé dans la maladie cœliaque en raison de leurs propriétés physicochimiques et de leur capacité de liaison à des peptides spécifiques désaminés par la transglutaminase tissulaire 2 (tTG2) [29].

Les deux HLA-DQ2 et HLA-DQ8 contiennent des poches chargées positivement avec une préférence pour la liaison des particules chargées négativement [29].

Plus précisément, dans DQ2, la lysine β 71 lui confère une préférence pour la liaison de résidus peptidiques chargés négativement aux positions P4, P6 et P7. Le polymorphisme du résidu β 57 de DQ8 peut créer un environnement basique avec une préférence pour la liaison des résidus chargés négativement à P9 [29].

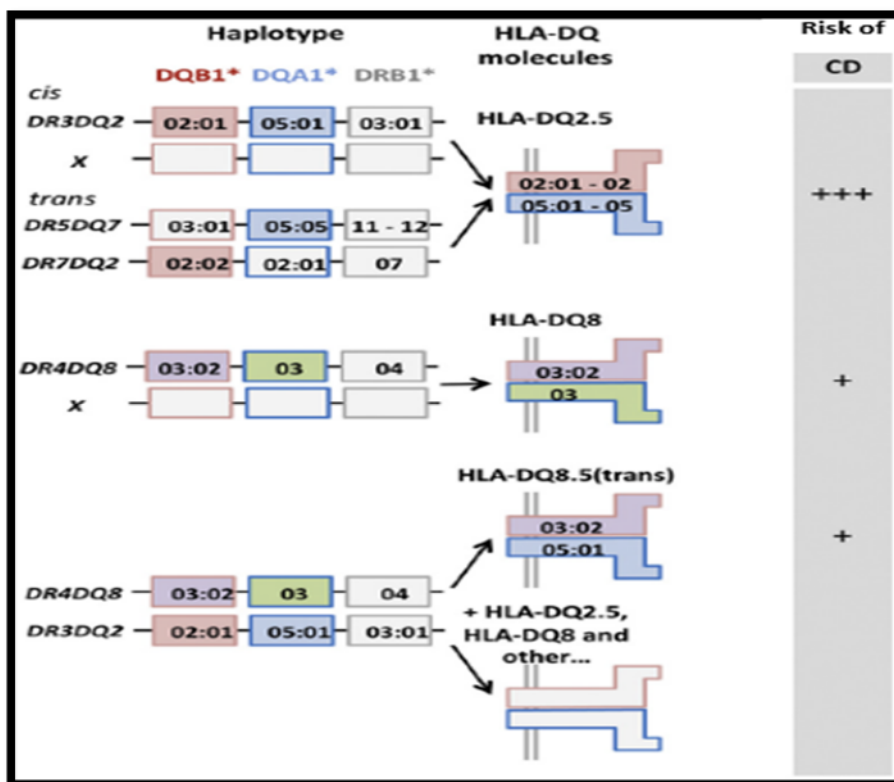


Figure 3 : L'association de la molécule HLA classe II à MC [30].

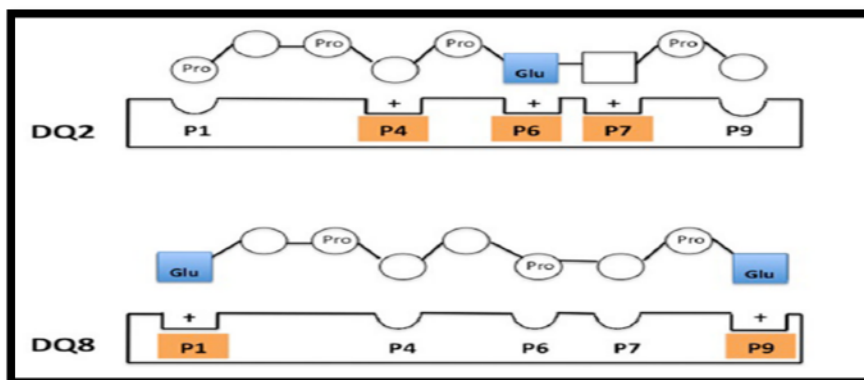


Figure 4 : Les complexes CMH classe II-peptide de gluten [31].

3.1.3. Gène non HLA et MC

Depuis la première étude d'association (cas/témoins) pangénomique (GWAS) sur la maladie cœliaque a été publié en 2007, un total de 40 non-HLA loci ont été suggérés comme étant associés à la maladie cœliaque [32].

Un exemple d'association, le gène CTLA-4 qui codant pour la protéine 4 associée au lymphocyte T Cytotoxique, porte sur le chromosome 2. Cette protéine est impliquée dans la régulation et l'activation des lymphocytes T [25].

Le polymorphisme des gènes codant pour l'interleukine 10 (IL 10), le TNF- α et le TGF- β intervient aussi dans la maladie. Les interleukines IL-10, aux propriétés antiinflammatoires, seraient moins produites chez un patient atteint de la maladie cœliaque que chez un individu sain. Ce facteur pourrait augmenter la gravité de la maladie [25].

3.2. Facteur environnementaux

Même chez les jumeaux monozygotes, la concordance n'est que d'environ 85%. L'absence de concordance suggère que des facteurs non génétiques sont cruciaux dans le développement de la MC. Le facteur de risque le plus évident est l'exposition au gluten [33].

3.2.1. Rôle du gluten

C'est un complexe moléculaire insoluble, obtenu par lavage à l'eau, des farines de céréales. Le gluten du blé contient environ 80 % de protéines. Les protéines responsables d'intolérance au gluten du blé sont les prolamines, riches en proline et glutamine, représentant 70 % des protéines totales [34].

Parmi les prolamines de blé, on distingue des protéines monomériques les gliadines et les gluténines. De manière équivalente aux prolamines du blé [34].

En physiologie, après ingestion et hydrolyse du gluten, les gliadines et leurs peptides dérivés restent dans la lumière intestinale et ne sont pas assimilés [35].

Cependant, dans certaines situations avec augmentation de la perméabilité intestinale, ces molécules peuvent pénétrer à travers la barrière intestinale. Certains peptides comme le peptide 31-49 ont une action directement toxique sur la muqueuse intestinale, d'autres peptides sont nommés "immunogènes" induisent une réponse immune T et B [35].

3.2.2. Autre facteur environnementaux

Les infections gastro-intestinales est une hypothèse de longue date dans MC. La présence de bactéries adhérentes à la muqueuse a été récemment observée chez les patients actifs mais leur adhérence pourrait être secondaire à l'inflammation [36].

Une hypothèse plus vraisemblable est la production au cours d'infections intestinales de cytokines pro-inflammatoires, notamment d'interféron alpha (IFN- α) et d'interleukine-15 induites en particulier en réponse à des infections par des virus à ARN double-brin. Confortant cette hypothèse, une étude épidémiologique récente suggère une association entre des infections répétées à rota virus et le déclenchement de la maladie cœliaque chez le nourrisson. En outre, ces deux cytokines sont produites en excès chez les patients cœliaques [36].

3.3. Dérégulation immunitaire

MC est due à une double réponse immune aberrante : une réponse immune innée qui semble la plus précoce et la réponse immune adaptative.

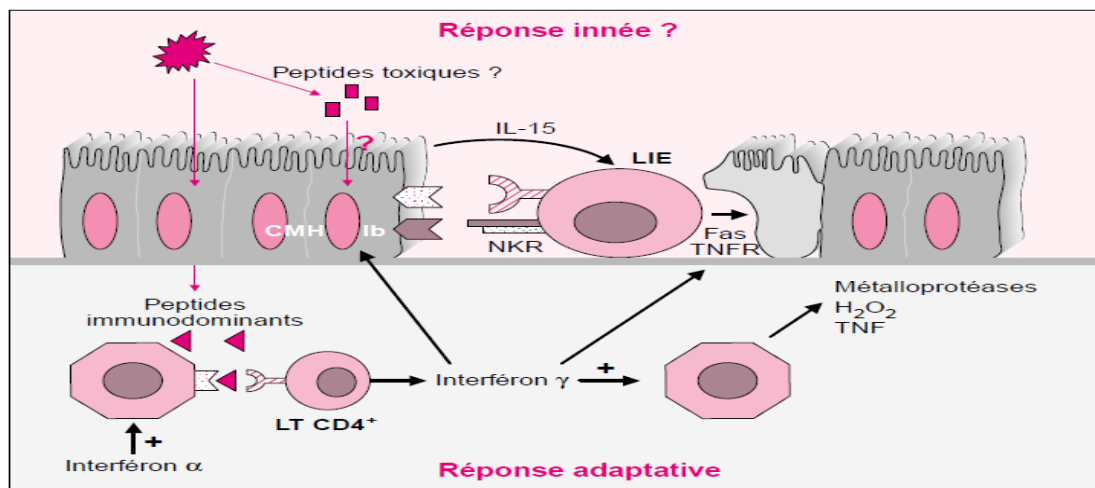


Figure 5 : hypothèse physiopathologique [37].

La transglutaminase tissulaire de type 2 (tTG) est une enzyme ubiquitaire, dont le rôle physiologique est la régénération cellulaire et le remodelage tissulaire. Son implication dans la physiopathologie de la MC a été prouvée. Elle est responsable de la désamination des résidus glutamine des peptides de gliadine en acide glutamique chargés négativement, favorisant leur ancrage au sein des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité DQ2/DQ8 [38].

Cette association conduit à une présentation des peptides de gliadine désaminés aux lymphocytes T CD4+ de la lamina propria chez ces individus génétiquement prédisposés [39].

Les lymphocytes T secrètent diverses cytokines, notamment celles de type Th1, comme l'interféron γ , qui seraient en partie responsables des lésions de la muqueuse intestinale. [39].

De cette présentation antigénique découle également la présence des anticorps (Ac) anti-gliadine (AGA) et anti-transglutaminase tissulaire (Ac anti-tTG) observés au cours de la maladie, probablement par formation de néoépitopes lors de la complexation de la transglutaminase avec les peptides de gliadine [39].

Il existe une augmentation du nombre de lymphocytes intraépithéliaux dans les biopsies de patients atteints de maladie cœliaque. Cependant, elle n'est pas spécifique de la maladie. Le

nombre de lymphocytes T CD8+ TCR $\alpha\beta$ (T cell receptor), résultant de l'activation des lymphocytes T CD4+, n'est augmenté qu'en cas de maladie active [40].

De très nombreuses cellules T présentant un TCR $\gamma\delta$ ont été mises en évidence localement au niveau de la muqueuse intestinale, cellules liées à l'immunité innée. [41].

L'IL15 surexprimée dans l'intestin des patients malades semble être le l'élément le plus important du système immunitaire non spécifique au cours de cette pathologie. Si l'IL15 stimule la cytotoxicité des lymphocytes T CD8+, elle favorise également l'expression de l'antigène A lié à la chaîne du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MICA) sur les entérocytes, et l'expression de son ligand NKG2D sur les cellules cytotoxiques [42].

Cette voie d'activation pourrait être à l'origine de la destruction des villosités. Cette cytokine serait sécrétée par les entérocytes et les cellules dendritiques. Elle pourrait également favoriser l'apparition des lymphomes intestinaux [43].

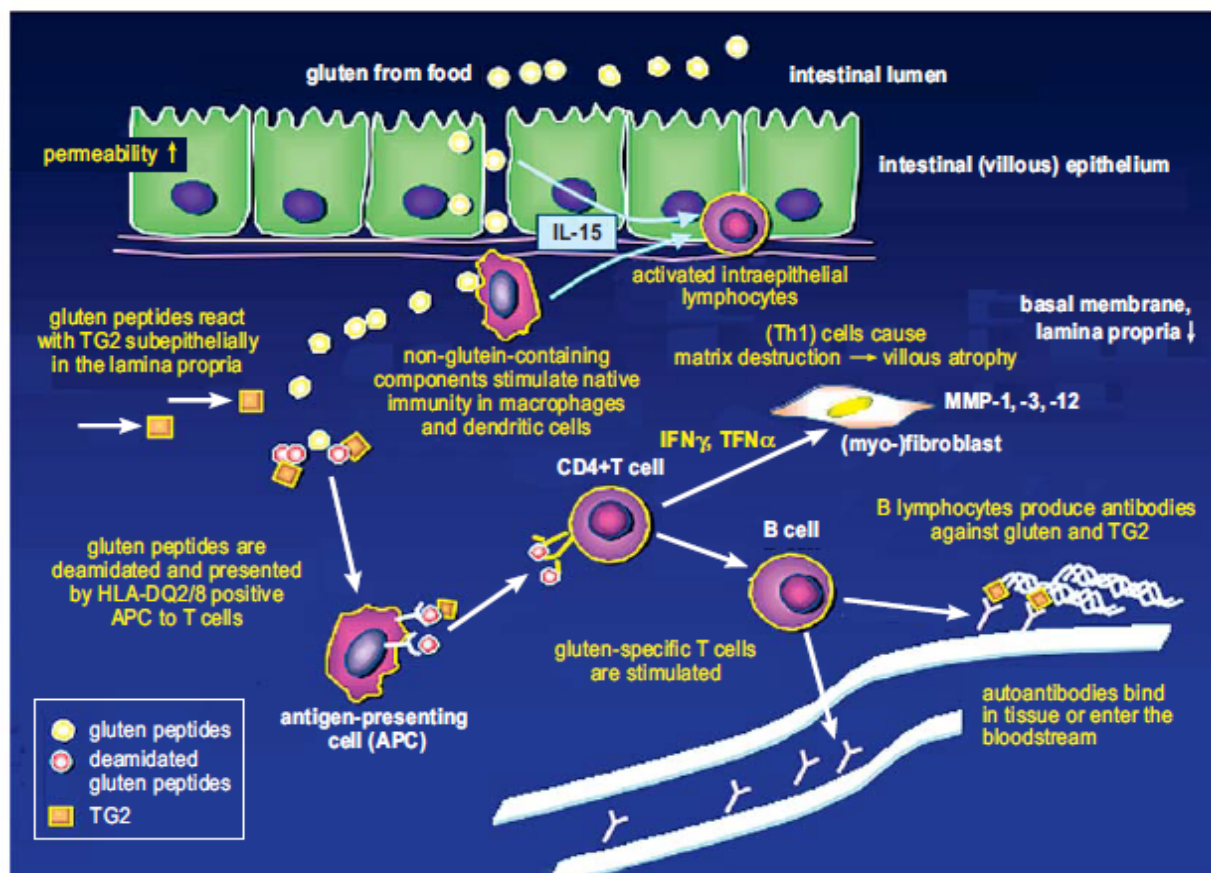


Figure 6 : La pathogénèse de la maladie cœliaque [44].

4. Diagnostic

Le diagnostic de la MC repose sur la combinaison d'arguments cliniques, sérologiques, histologiques et génétique [45]. En franchir de la présentation clinique, la démarche diagnostique comprend :

4.1. Recherche des auto-anticorps

Les marqueurs d'auto-immunité constituent la première étape du diagnostic. Un dosage des immunoglobulines (Ig) A anti transglutaminase (IgAAT) ou anti-endomysium (IgAAE) doit être prescrit, la recherche d'un déficit en IgA par dosage pondéral de ces Ig doit être effective [46].

Tableau IV : Auto-anticorps et MC [19].

Anticorps	Technique de détection	Isotype	sensibilité	Spécificité	Remarques
Anti-endomysium	Immunofluorescence directe	IgA	>90%	>95%	Onéreux lecture subjective au microscope
Anti-transglutaminase	ELISA	IgA (ou IgG si déficit en IgA)	> 90%	>99%	Simple et automatisable
Anti-réticuline	Immunofluorescence indirecte		médiocre	excellente	Plus utilisé
Anti-gliadine	ELISA	IgA IgG	53-100 57-100	65-100 42-98	Peu spécifique : pas recommandé

4.1.1. Anticorps IgA anti-endomysium (IgA anti-EMA)

Les anticorps IgA anti-endomysium se lient à l'endomysium (le tissu conjonctif se trouvant autour du muscle lisse) produisant un aspect très typique [47]. Sa détection nécessite une technique l'immunofluorescence indirecte utilisant comme substrat, l'oesophage de singe ou le cordon ombilical humain [45].

La cible des anticorps a été identifiée comme la transglutaminase tissulaire (transglutaminase 2). Le résultat du test est tout simplement positif ou négatif puisque même des titres bas d'anticorps sériques IgA anti-endomysium sont spécifiques de MC [47].

4.1.2. Anticorps anti-transglutaminase tissulaire (IgA anti-tTG)

La tTG une enzyme intracellulaire ubiquitaire est la cible des autoanticorps caractéristiques de la MC [45].

Cette enzyme a de nombreuses fonctions, y compris la désamidation des peptides de gliadine [43].

Un large éventail de tests avec des caractéristiques différentes mesurent les anticorps de transglutaminase tissulaire le plus souvent par dosage quantitatif par immunoadsorption enzymatique [48].

Les substrats pourraient être du foie de cobaye (essais de première génération), dérivé de globules rouges humains et recombinant humain [48].

En général, la spécificité tend à être plus élevée avec les analyses basées sur l'homme par rapport aux tests de première génération. La détection des anticorps anti-transglutaminase des tissus IgA est le test sérologique de choix pour le diagnostic de MC [48].

4.1.3. Anticorps IgA et IgG anti-gliadine (tests IgA anti-AGA et IgG anti-AGA)

La gliadine est le composant majeur des protéines de stockage du blé, appelées collectivement gluten [47].

La gliadine purifiée est facilement disponible et est utilisée comme antigène dans les tests ELISA pour la détection des anticorps anti-gliadine sériques. Les taux d'anticorps anti-gliadine sont fréquemment élevés dans les maladies cœliaques non traitées et les tests anti-gliadine ont été utilisés pendant quelques années comme aide au diagnostic [47].

Ces tests démontrent une sensibilité et une spécificité modérées, les tests IgA étant supérieurs aux tests IgG, mais leur valeur prédictive positive est cependant relativement faible en général [47].

4.1.4. Anticorps anti-réticuline

La recherche d'anticorps anti-réticuline d'isotype (IgA) par immunofluorescence indirecte, sur rein-estomac foie de rat, présente des performances diagnostiques très en retrait

des tests décrits ci-dessus, notamment en termes de sensibilité, et ne doit plus être réalisée [49].

Leur découverte fortuite lors d'explorations effectuées dans un autre cadre (hépatopathies auto-immunes notamment) devrait cependant conduire à la réalisation d'une sérologie cœliaque conventionnelle [49].

4.2. Typage HLA DR-DQ

MC a une forte composante génétique. Le risque augmente en présence des hétérodimères HLA-DQ2 (encodés par les allèles A1*05 et B1*02) et HLA-DQ8 (encodés par les allèles A1*03 et B1*0302). Presque tous les patients atteints de maladie cœliaque sont porteurs de l'un ou l'autre de ces types de HLA (HLA-DQ2 chez quelque 95 % des personnes atteintes de maladie cœliaque et HLA-DQ8 chez 5 %) [50].

Le typage HLA peut être utile chez les patients séronégatifs, chez les patients pour qui les résultats histologiques sont équivoques et le diagnostic incertain, et chez les patients sous régime sans gluten [51].

Un résultat négatif pour la recherche de HLA-DQ2 et HLA-DQ8 a une valeur prédictive négative élevée [51].

En revanche la présence de HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 n'a qu'une faible valeur prédictive positive : en effet ces molécules sont présentes dans environ 30 % de la population générale, et la maladie cœliaque ne touche qu'environ 1 personne sur 30 exprimant ces molécules. Ainsi, le rôle essentiel du typage HLA-DQ est d'exclure le diagnostic de maladie cœliaque ou de le rendre peu probable [51].

Le typage des antigènes des leucocytes humains est aussi utile pour identifier les proches parents à risque d'une MC qui pourraient bénéficier d'un dépistage longitudinal de la MC par sérologie [52].


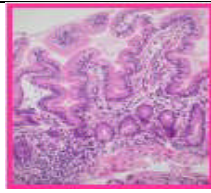
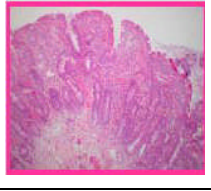


4.3. Diagnostic histologique

Le diagnostic de certitude repose sur l'analyse anatomopathologique des biopsies intestinales [43].

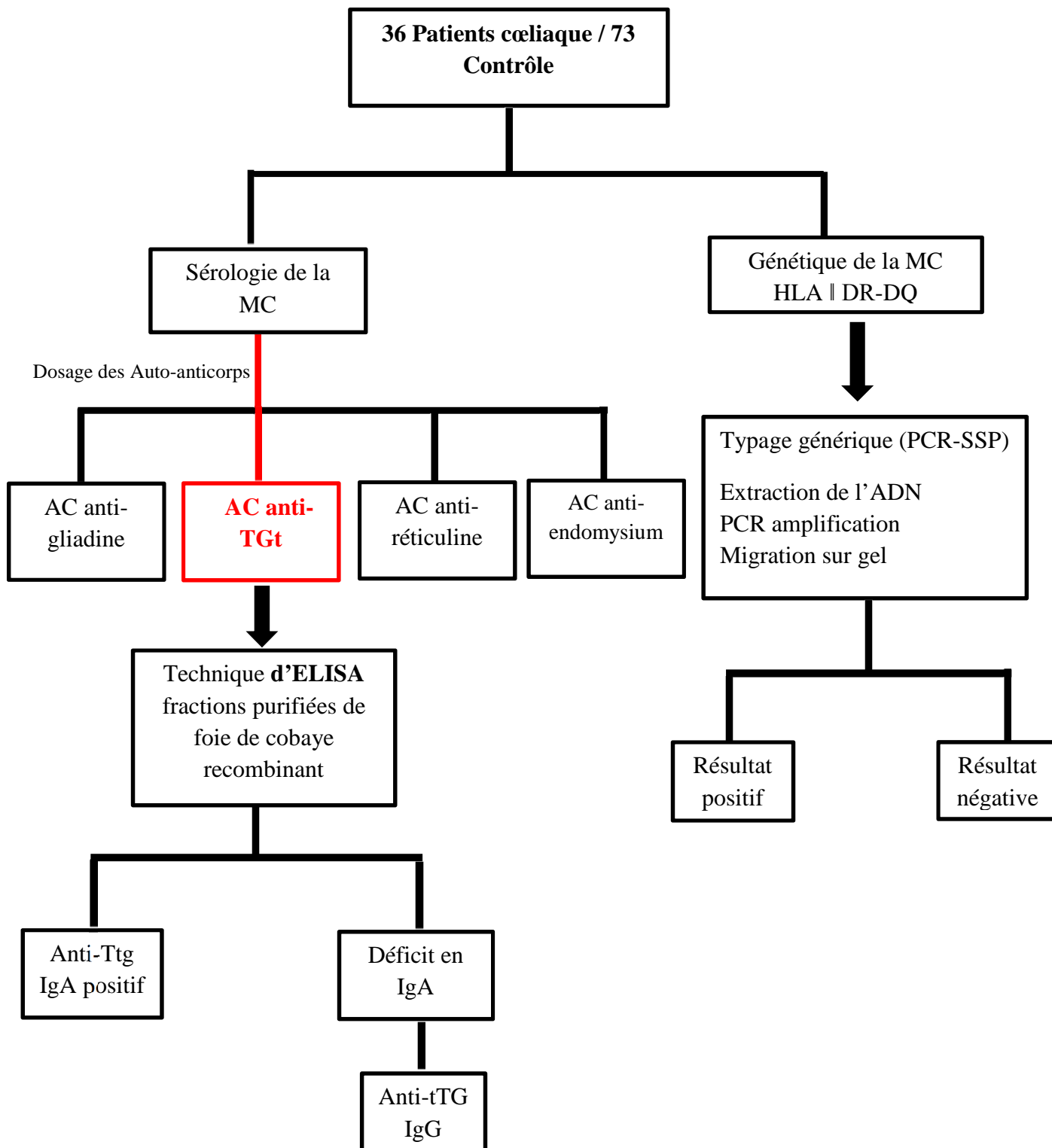
De multiples biopsies (au minimum sur quatre sites différents) doivent être réalisées. L'analyse histologique de la biopsie duodénojunale doit être réalisée par un praticien expérimenté, qui s'attache à rechercher une atrophie des villosités intestinales. [43].

Les biopsies montrent aussi une infiltration lymphocytaire, très caractéristique de la maladie. L'importance des lésions est estimée selon la classification de Marsh [43].

Tableaux VI : Classification de Marsh-Oberhuber de maladie cœliaque [53].

Classe de Marsh	Type de lésion	Architecture Villous	Cryptes	IELs	Biopsies intestines
Marsh 0	Préinfiltratif	Normal	Normal	<30/100 entérocytes	
Marsh I	Infiltrative	Normal	Normal	>30/100 entérocytes	
Marsh II	Infiltrative-hyperplasique	Normal	Hyperplasie	>30/100 entérocytes	
Marsh III 3A 3B 3C	Appartement destructif Appartement destructif Appartement destructif	Atrophie légère des villosités Atrophie villositaire modérée Atrophie villositaire totale	Hyperplasie Hyperplasie Hyperplasie	>30/100 entérocytes	
Marsh IV	Atrophie-hypoplasique	Atrophie villositaire totale	Hyperplasie	>30/100 entérocytes	

Pour cette étude nous avons utilisé deux techniques complémentaires pour confirmer l'atteinte de la MC, une technique de typage générique par la réaction de polymérisation en chaîne par amorces spécifiques des séquences (PCR-SSP) pour étude génétique et une technique de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) pour étude sérologique des auto-anticorps anti transglutaminase.



1. Population étudiée :

Notre étude (cas/témoins) a été réalisée sur un échantillon de **36** patients cœliaque, adressés au laboratoire d'immunologie de l'Hôpital central de l'Armée (HCA) d'Ain Nadja pour réaliser le typage HLA classe II et un examen sérologique. Durant la période de 04 mois de février à juin 2017.

La population de témoins se compose de **73** individus sains ne présentent aucune maladie chronique et sans antécédents familiaux de la maladie cœliaque ou autre entéropathie.

Chaque patients dispose d'une fiche clinico-biologique répertoriant la paramètres nécessaire à notre étude.

Tableau VI : caractéristiques générales des patients et sujets témoins

Caractéristique	Patients	Témoins
Age moyen	26,94	36
Femme	26	49
Homme	10	24
Sexe ratio	2,6	2,04
Totale	36	73

Les échantillons prélevés dans des tubes avec anti-coagulant (EDTA (Acide Ethylène Diamine Tetraacétique) sur les quels sont mentionnés les noms et les prénoms des patients ont été conservé à -20°C, un deuxième tube sans anti-coagulant est nécessaire pour le test sérologiques.

2. Méthodes

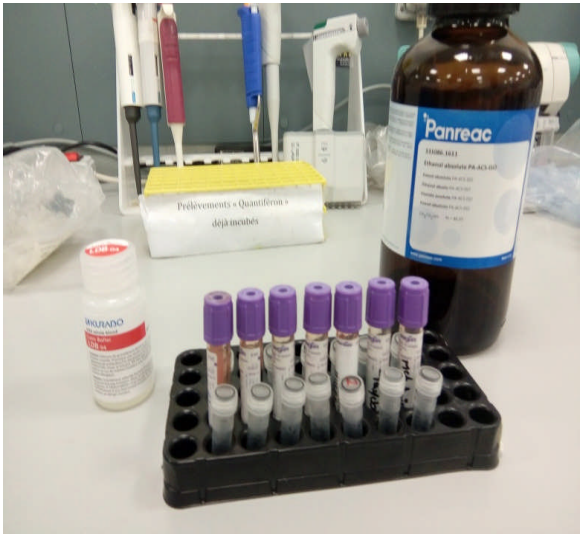

2.1. Typage générique HLA de classe II :


2.1.1. Extraction de l'ADNg :

Le kit « Quick gene mini-80 fujifilm » est un système semi-automatique permet l'extraction de l'acide désoxyribonucléique (ADN) à partir d'un échantillon de 200 µl de sang.

Le milieu d'adsorption de l'acide nucléique est une membrane poreuse de 80 microns d'épaisseur, l'extraction basée sur la propriété qu'ont les particules de silice d'adsorber sélectivement les acides nucléiques.

L'extraction se déroule en trois étapes :

Première étape :	la lyse cellulaire
<p>Après décongélation d'un échantillon de 200µl de sang total à température ambiante au moment d'utilisation.</p> <p>Dans un tube eppendorf de sang total ont été additionné à 30µl de protéinase K lyophilisée plus 250µl de solution de lyse LDB (Lysis Dilution Buffer) le tout est vortexé pendant 15 secondes et centrifugé au centrifugeuse de paillasse puis incubée dans l'étuve pendant 5 min à 37°C,ensuit 250µl d'éthanol sont additionnés à la solution qui est vortexée et centrifugée.</p>	
Deuxième étape :	la précipitation de l'ADN
<p>Le lysat obtenu est transféré dans une colonne cartridges (CAS) posé sur un tube à déchets (WTS) puis centrifugé à 8000 tpm/1min, un premier lavage WDB (Wash Dilution Buffer) puis une pression est exercée par l'appareil Quick Gene-Mini80 afin d'isoler l'ADN dans la membrane de silice et éliminer les protéines et les résidus un deuxième et troisième lavage sont effectués dans les mêmes conditions.</p>	

Troisième étape :	l'élution de l'ADN
<p>Les tubes à déchets WTS sont remplacées par des tubes Eppendorf (déplacement de portoir vers la deuxième position) afin d'éluer l'ADN en ajoutant 200µl de solution d'élution CDB-02 (Elution Buffer) puis une pression est exercée une nouvelle fois, le liquide recueilli (l'éluat) dans les Eppendorf contient l'ADN génomique.</p>	

Contrôle de l'ADN extrait :

1. Dosage de l'ADN :

Il dosage s'effectue par spectrophotométrie, la méthode de spectrophotométrie est utilisée pour une quantification précise de l'ADN et de déterminer la pureté de l'ADN extrait. Ainsi, la concentration en ADN est déterminée par mesure de la DO au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 260 nm pour des solutions diluées au 1/50 ou 1/100, sachant que l'ADN a un spectre d'absorption en UV maximum à 260 nm.

Ce spectre d'absorption est proportionnel à la concentration de l'ADN. Cette unité de densité optique (DO) à 260 nm correspond à 50ug d'ADN double brin en tenant compte de la dilution réalisée.

L'estimation de la concentration de l'ADN est déterminée selon la formule suivante :

$$[\text{ADN}] = \text{DO} \times \text{facteur de dilution} \times 50 \text{ en (ng/}\mu\text{l)}$$

2. Indices de pureté de l'ADN

Une solution d'ADN doit avoir un rapport DO 260/280 compris entre 1,8 et 2,2. Ce rapport est : - Inférieur à 1,8 : l'ADN est contaminé par des protéines.

- Supérieur à 2,2 : il est contaminé par de l'ARN.

2.1.2. Technique de typage par (PCR-SSP)

Principe :

Cette technique (**réaction de polymérisation en chaîne par amorce spécifique de séquence PCR-SSP**) est basée sur une amplification par PCR utilisant des amorces spécifiques de chaque allèle du HLA. Les amorces utilisées doivent être parfaitement complémentaires de la séquence d'ADN cible pour donner un produit d'amplification lors d'une réaction de PCR (résultat positif). Les amorces non complémentaires ne se lient pas à l'ADN et il ne se produit pas d'amplification (résultat négatif).

Après la PCR, les fragments d'ADN amplifiés sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose et visualisés par coloration avec le bromure d'éthidium sous lumière UV. L'interprétation des résultats est basée sur la présence ou absence de fragments spécifiques amplifiés. Un couple d'amorces de contrôle interne est intégré dans chaque réaction PCR. Ce couple amplifie une région conservée du gène de la β -globuline humaine qui est présente dans tous les échantillons d'ADN et permet de vérifier l'efficacité de la réaction PCR (54).

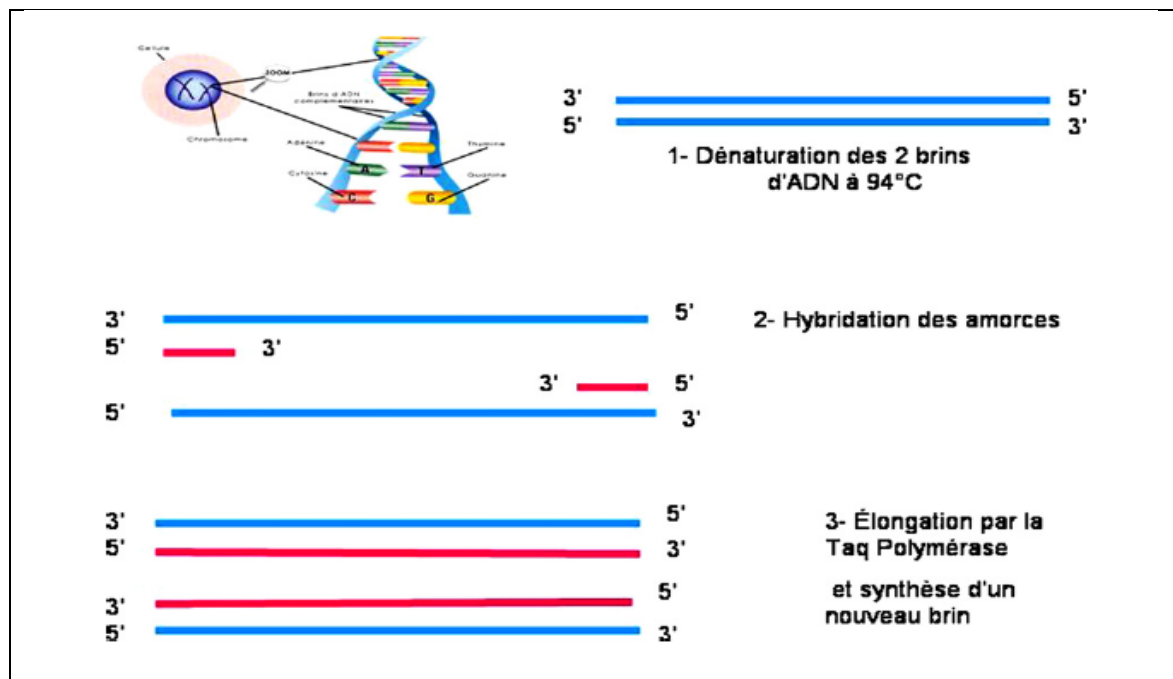


Figure 7 : Les principales étapes de la réaction de PCR [54].

Etapes de la technique :

Le kit utilisé est :INNO-TRAIN/HLA-Ready Gene DRDQ low (conservée à -20°C et retirée juste avant utilisation) . Pour chaque patient, une plaque de 48 puits est préparée.

Tableau VII : Mélange réactionnel pour la PCR.

Puits de 10 μ l test	Tampon d'PCR	Eau (μ l)	ADN génomique (50ng/ μ l)	Taq polymérase (μ l)
48	230	304	62,5	3,5

Pré amplification

Dans un tube Eppendroff 304 μ l d'eau distillée et 230 μ l de tampon PCR (conservé à -20°C) sont ajouté. Le tube est vortexé pendant 15 secondes. 12 μ l de ce mélange sont déposés dans le premier puits de contrôle négatif.

Après cela, 62,5 μ l d'ADN génomique (50ng/ μ l) préalablement vortexé pendant 20 secondes et 3,5 μ l de taq polymérase sont ajoutés. Le tout est vortexé pendant 20 secondes et 12 μ l de ce mélange réactionnel sont déposée dans chaque puits de la plaque, à l'exception de puits de contrôle négatif. Afin d'éviter une contamination des amorces, nous avons fait attention à ce que l'extrémité de la pipette n'entre pas en contact avec les amorces. Pour cela le mélange est déposé sur la paroi des puits.

Les tubes de réaction de la plaque sont hermétiquement fermés à l'aide d'un couvercle afin d'éviter l'évaporation.

Amplification

Une fois que les plaques sont prêtes. Elles sont placées dans le thermocycleur (Applied Biosystems 9700), qui peut faire varier la température de l'échantillon de façon très précise. Un programme spécifique INNOTRAIN-Ready est lancé et l'amplification dure 1heure 35 minutes. (Tableau VIII)

Tableau VIII : programme PCR.

Température	Durée du cycle	Effet
60°C	1 min	Activation de la taq polymérase
95°C	10 min	Dénaturation initiale
95°C (40 fois)	15 sec	Dénaturation des sondes amplifiées
60°C	1 min	Hybridation-élongation
60°C	1 min	Activation des fluorochromes et préparation à la lecture

2.1.3. Révélation des amplifications par électrophorèses sur gel d'agarose.

Préparation du gel d'agarose à 2% :

Dans un bécher, porter à ébullition 10g d'agarose (Genagarose) et 500ml de tampon TAE, mettant le tout à la micro-onde pendant 7 à 10 min ou jusqu'à dissolution complète.

Quand le gel est prêt il est mis sous la hotte ou 5 gouttes de BET lui ajoutés, verser en suite la solution d'agarose sans faire de bulles d'air dans le support de gel préparé et étanche et mettre en place des peignes pour créer des puits de 10µl, le gel doit reposer pendant 15 min sous la hotte chimique à la température ambiante jusqu'à la polymérisation

L'électrophorèse du Gel d'agarose :

Après la polymérisation de l'agarose le gel est placé dans la chambre à gel et les peignes sont retirés et recouvrir le gel de TBE 1X les puits du gel doivent être complètement recouverts de tampon

Dans chaque puits 10µl du produit de PCR sont déposés à l'aide d'une micropipette à 8 canaux, l'électrophorèse se fait pendant 25 min à 160 volts, la distance de migration du rouge crésol devrait être de l'ordre de 1 à 1,5 cm révélées et visualisées par marquage au bromure d'éthidium BET et observées sous lumière UV à l'aide d'un équipement de capture de photo (GEL DOC XR Biorad).

Interprétation des résultats :

Les mélanges d’amorces HLA contiennent des amorces témoins qui amplifient un fragment de l’hormone de croissance de l’homme (human growth hormone, HGH), long de 1069 pb.

Ces amorces présentent une concentration plus faible que les paires d’amorces spécifiques des allèles et servent de contrôle interne de l’amplification.

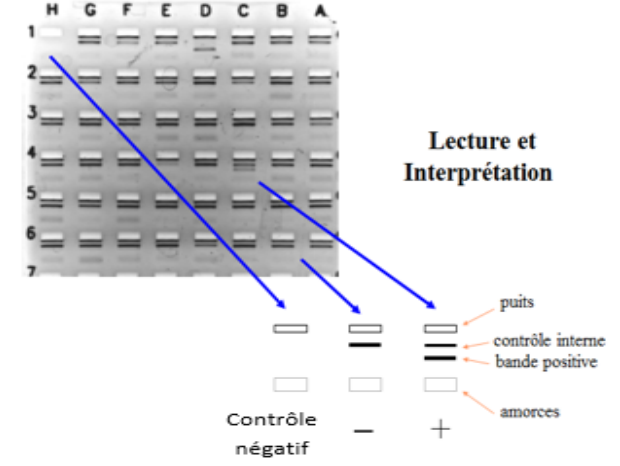
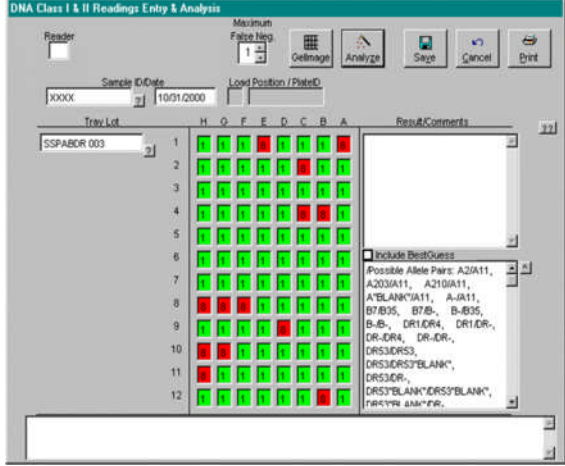
Cette amplification témoin a généralement toujours lieu, c’est-à-dire aussi bien en présence qu’en l’absence d’un fragment de PCR spécifique d’un allèle ou d’un groupe. La bande témoin est donc visible dans toutes les prises d’essai d’amplification génique.

L’interprétation du test repose sur le fait de savoir si une bande d’ADN spécifique est présente dans le gel ou non. La taille des fragments amplifiés d’ADN ne devra pas nécessairement être prise en compte, mais pourra l’être à titre d’aide lors de l’interprétation du test.

Les résultats sont interprétés à l’aide des tableaux fournies dans le kit et du logiciel INNO TRAIN DR-DQ (HLA-READY ENE DR-DQ Low).

Ce programme permet de révéler l’allèle ou le groupe d’allèles correspondant.

Sur la photographie les produits apparaissent sous forme de bandes. Les bandes spécifiques sont exprimées en nombre de paires de bases en référence au marqueur de taille utilisé pour l’électrophorèse.

Révélation des bandes de l’électrophorèse	Logiciel INNO TRAIN DR-DQ																																																																																																																					
 <p>Lecture et Interprétation</p> <ul style="list-style-type: none"> puits contrôle interne bande positive amorce Contrôle négatif 	 <p>DNA Class I & II Readings Entry & Analysis</p> <p>Sample ID/Date: XXXXX / 10/01/2000</p> <p>Tray Lot: SSPABOR 003</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>H</th> <th>G</th> <th>F</th> <th>E</th> <th>D</th> <th>C</th> <th>B</th> <th>A</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td></tr> <tr><td>2</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td></tr> <tr><td>3</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td></tr> <tr><td>4</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td></tr> <tr><td>5</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td></tr> <tr><td>6</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td></tr> <tr><td>7</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td></tr> <tr><td>8</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td></tr> <tr><td>9</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td></tr> <tr><td>10</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td></tr> <tr><td>11</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td></tr> <tr><td>12</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td><td>■</td></tr> </tbody> </table> <p>Possible Allele Pairs: A2/A11, A23/A11, A21/A11, A*BLANK/A11, A-A11, B7/B35, B7/B-, B-B35, B-B-, DR1/DR4, DR1/DR-, DR-DR4, DR-DR-, DR53/DR53, DR53/DR53*BLANK, DR53/DR-, DR53/DR*, DR53*BLANK/DR53*BLANK, DR53/DR-DR53/DR-</p>		H	G	F	E	D	C	B	A	1	■	■	■	■	■	■	■	■	2	■	■	■	■	■	■	■	■	3	■	■	■	■	■	■	■	■	4	■	■	■	■	■	■	■	■	5	■	■	■	■	■	■	■	■	6	■	■	■	■	■	■	■	■	7	■	■	■	■	■	■	■	■	8	■	■	■	■	■	■	■	■	9	■	■	■	■	■	■	■	■	10	■	■	■	■	■	■	■	■	11	■	■	■	■	■	■	■	■	12	■	■	■	■	■	■	■	■
	H	G	F	E	D	C	B	A																																																																																																														
1	■	■	■	■	■	■	■	■																																																																																																														
2	■	■	■	■	■	■	■	■																																																																																																														
3	■	■	■	■	■	■	■	■																																																																																																														
4	■	■	■	■	■	■	■	■																																																																																																														
5	■	■	■	■	■	■	■	■																																																																																																														
6	■	■	■	■	■	■	■	■																																																																																																														
7	■	■	■	■	■	■	■	■																																																																																																														
8	■	■	■	■	■	■	■	■																																																																																																														
9	■	■	■	■	■	■	■	■																																																																																																														
10	■	■	■	■	■	■	■	■																																																																																																														
11	■	■	■	■	■	■	■	■																																																																																																														
12	■	■	■	■	■	■	■	■																																																																																																														

2.2. Le dosage des auto-anticorps anti-transglutaminase (tTG) par technique d'ELISA

L'examen sérologique permet le dosage des auto-anticorps anti-transglutaminase (tTG) de class IgA pour confirmer le diagnostic de la maladie cœliaque.

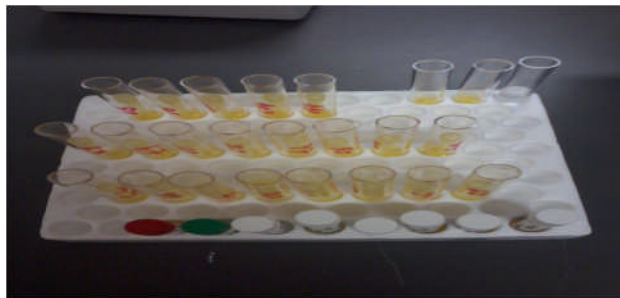
Les sérums sont récupérés après centrifugation 2500-3000 tours/minute pendant 8-10 minute par la suite les sérums sont conservés au maximum 2 à 3 jours entre 2° - 8° C.

Principe de technique d'ELISA

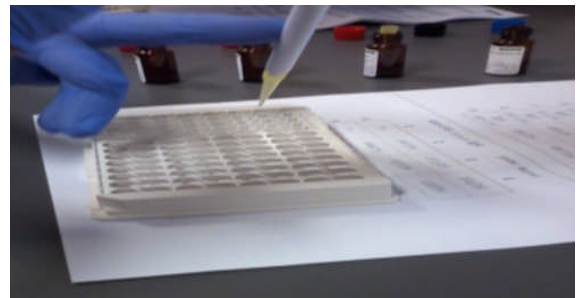
L'ELISA ou **Enzyme Linked Immunosortent Assay** développée depuis 1971 et une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps dans les puits d'une plaque de microtitration sont recouverts d'antigène tTG humains, la réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

Mode opératoire :

1-diluer les sérums au 1/101 avec du PBS



2-en lever les barrettes du sachet et les insérer fermement à l'intérieur du cadre porteur et distribuer 100µl de calibrateurs de contrôle et d'échantillons dans les puits



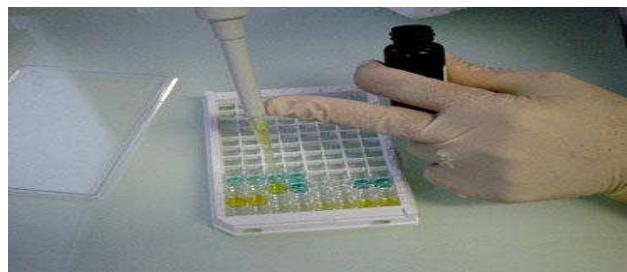
3- incuber pendant 30 min à température ambiante



4- aspirer le liquide contenu dans les puits et laver ces derniers 3 fois avec du tampon de lavage



5- distribuer 100µl de solution de conjugué dans les puits correspondants et incuber pendant 30 min à l'abri de la lumière



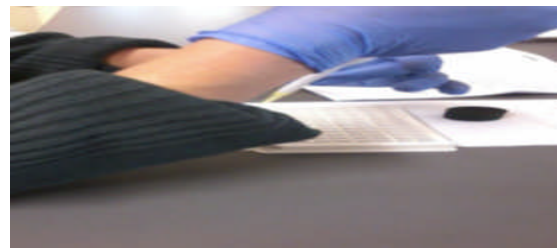
6- aspirer le liquide contenu dans les puits et laver ces derniers 3 fois avec du tampon de lavage



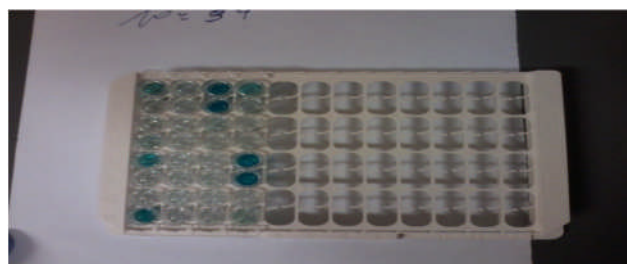
7- distribuer 100µl de solution de substrat par puits et incuber 10min à l'abri de la lumière.



8. Le dépôt de 100 microlitre de la solution de chromogène/substrat dans chaque puits de la microplaque



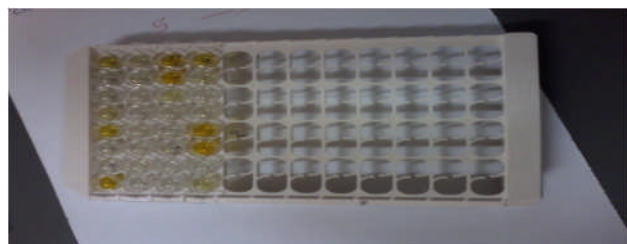
9. Incubation 15 minutes à température ambiante (protéger la microplaque de la lumière directe du soleil).



10- Distribuer 50µl de solution d'arrêt par puits



11- lire l'absorbance (DO) à 450nm dans 30min après addition de la solution d'arrêt avant la mesure on a agité la microplaque



3. Tests statistiques

Fréquence alléliques, phénotypique et haplotypique

La transmission des allèles HLA suit un mode autosomal codominant, la fréquence allélique des gènes HLA DRB1 et HLA DQB1 est déterminée par comptage des sujets portant un phénotype donné en tenant compte des homozygote qui comptabilisés deux fois.

Les fréquences phénotypiques et haplotypique sont évaluées par le même procédé sauf que l'homozygote est compté une seul fois.

Odds Ratio

Odds Ratio (OR) permet d'apprécier l'intensité de l'association entre marqueur et une maladie. Son évaluation dans cette étude a été obtenue par le logiciel GraphPad Prism 7. Ce même logiciel permet d'obtenus le Chi-squared Pearson test et de déduire le degré de signification « p »

- Si : $P > 0.05$: Non significatif.
- Si : $P < 0.05$: Est significatif
- Si : $P < 0.01$: Très significatif.
- Si : $P < 0.001$: Hautement significatif.

Le gluten est le déclencheur principal de la maladie cœliaque, en association avec les molécules HLA déclenchent une réaction immunitaire médiée par anticorps anti-transglutaminase tissulaire, qui a été identifiée comme la principale cible antigénique des EMA en 1997.

L'analyse de nos résultats montre que la fréquence de la maladie cœliaque dans notre population est plus fréquente chez les patients de sexe féminin que chez le sexe masculin avec des valeurs respectives de 72,2% et 27,8%, nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature, en effet les études épidémiologiques réalisées dans le monde ont montré que la fréquence des maladies auto-immunes dans la population générale était plus élevée chez la femme que chez l'homme [55-56].

Pour cette série, l'anémie représente le signe clinique le plus fréquent (30%) ces données sont en accord avec les travaux de Colombel (1966) [58]. Cette anémie due à une carence martiale est aussi fréquente chez les malades asymptomatiques que chez les malades symptomatiques.

Les signes digestifs, types diarrhées chroniques a été observée dans (31%) des cas. La diarrhée fait de selles typiquement <bouse de vache> est les symptômes digestifs majeurs, retrouvé dans plus de 80% des cas (Schmits et al, 2008) [57].

Les vomissements, ce sont les premières conséquences de la malabsorption intestinale. Elles sont observées dans (22%) des cas.

Il y'a d'autres signes cliniques comme cholestase, ostéoporose, thyroïdite et alopecie qui représente (17%).

Les caractéristiques de notre population étudiée montrent d'une part la diversité des signes cliniques, et d'autre part une association avec des autres pathologies. Elle est également rapportée dans plusieurs travaux, telle que les séries de Kaller (2009) [69], Baudon (2001) [70]. et de Richhaid, I(2005) [20].

Phénotype de la population pour la molécule HLA classe II DQ

L'analyse des résultats du typage générique HLA montre que 77,77 % (28/36) des patients expriment phénotype DQ2 et/ou DQ8. Ce à démontre l'importance de ces deux molécules dans la pathologie [59].

L'hétérogénéité dans la prédisposition à la maladie cœliaque, peut être due à l'existence des différents peptides antigéniques dérivants du gluten. En effet il a été montré, que les molécules DQ2 captent et présentent des peptides de la fraction T-gliadine. En revanche la molécule DQ8 capte et présente des peptides de la fraction α -gliadine et également la gluténine.

Le phénotype HLA DQ2 est retrouvé chez 41,1% des patients ce qui montre une augmentation significative de la fréquence de ce phénotype dans la population de cœliaque (OR=3,26 ; $p= 2,7.10^{-3}$).

Cet allèle est le facteur génétique de susceptibilité le plus fréquent chez nos patients. Ces résultats sont rapportés dans la population de l'ouest algérien (73,71 %) par Boudjemaa (2005) [62] et dans la population algéroise selon Miliani (2013) 66,67% [60] et selon Djender et Lounici (2010) 76% [61].

Le phénotype HLA DQ8 est retrouvé chez (13,5%) des témoins ce qui montre une fréquence non significative (OR=1,8 ; $p= 0,129$). Ce résultat est significativement plus élevé comparé à celui de l'ouest algérien (13,2%) Boudjema (2005) [62] et inférieur à celui retrouvé dans la population d'Alger selon Miliani (2013) 33,33% [60] et selon Djender et Lounici (2010) 32% [61].

Le facteur génétique le plus important Identifié est la région CMH, qui contient les haplotypes codants pour les molécules HLADQ2 et HLA-DQ8. Ces deux haplotypes sont nécessaires mais pas suffisants pour le développement de la maladie. Ce qui laisse penser que d'autres gènes non-HLA contribuent à la pathogenèse de la maladie.

Allèles HLA DQB1

Nos résultats montre une augmentation significative de la fréquence des allèles HLA DQB1*02 (DQ2) et DQB1*0302 (DQ8) chez les patients par rapport aux témoins avec des fréquences respectives de 45,83% vs 24,66% (OR=6,94 ; $p=<0,001$) et de 12,5% vs 8,22% (OR=3,19 ; $p=1,99.10^{-2}$).

Ces résultats sont similaires à ceux retrouvés dans population algérien, pour les allèles DQ2 (41,67%) et DQ8 (18,75%) selon Miliani (2013) et significativement inférieur à celui retrouvé par Djender et Lounici (2010) DQ2 (50%) et DQ8 (18%) [60 ; 61].

Ce résultat concorde avec les données de la littérature qui décrivent l'allèle HLA DQ2 comme étant le facteur de susceptibilité le plus l'important, suivi par l'allèle DQ8 [64].

La fréquence de l'allèle HLA DQB1*06 (DQ6) est significativement plus élevée, chez les témoins 23,29% par rapport aux patients 6,94 % (OR=0,3 ; $p=2,89.10^{-2}$). Ces résultats sont similaire à ceux retrouvés dans les études présidant (Miliani, 2013 et Djender et Lounici, 2010) [60 ; 61] et ce retrouvés dans la population tunisienne ou l'effet protecteur de cet allèle a été confirmé [65].

Allèles HLA DRB1

Lors de l'analyse du polymorphisme HLA DR nous avons noté que la majorité de nos patients présentent l'allèle HLA DRB1*03 (DR17) (30,46%) significativement plus élevé chez les témoins 15,07%, (OR=2,48 ; $p= 2,5.10^{-2}$).

Ces résultats sont en accord à ceux retrouvés dans la population de l'ouest algérien (Boudjemaa, 2005) [62], dans la population d'Alger la fréquence noté est égale à 37,50%, ceux Djender et Lounici (2010) [61] noté 40% et ainsi que dans la plupart des études d'association HLA et maladies cœliaque [66].

Ceci confirme donc l'importance de l'allèle DR17(DR13) dans la survenue de la maladie cœliaque.

En revanche les allèles les plus fréquente chez les témoins avec des fréquences plus élevées à celle des malades ; HLA-DR13 (6) chez les témoins noté à 10,27% contre 8,33% chez les patients, (OR=0,332 ; $p=7,4. 10^{-2}$). Ceci explique qu'il est négativement associé à la MC, et elle confirmé par le résultat retrouvé dans la population d'Alger (Miliani, 2013 et Djender et Lounici, 2010) [60 ; 61].

Génotypes HLA DQB1/DQB1

L'analyse des génotypes montre que l'allèle HLA DQ2 à l'état homozygote (DQ2/DQ2) est plus augmenté chez les patients cœliaques (22,22%), que chez les témoins (6,84%) (OR=4,929 ; $p=4,3.10^{-3}$),

Ces patients présentent un risque important de développer la MC.

En effet, les CPA homozygotes pour HLA DQ2 provoquent des réponses cellulaires T spécifiques au gluten plus fortes que les CPA hétérozygotes HAL DQ2, ceci peut être expliqué par la forte concentration des molécules HLA DQ2 capables de présenter les peptides du gluten [67 ; 68]

En outre, l'homozygotie DQB1 * 02 peut être associée à un âge plus jeune de début de la maladie, et évolution cliniques des complications [69].

Leur prévalence est estimée à 2 % dans la population générale et représente 25 % des patients cœliaque [69].

L'allèle DQ8 en double dose (DQ8/DQ8) n'est pas significativement augmenté chez les patients par rapport aux témoins. Mais les patients présentant cette homozygotie DQ8/DQ8, présente aussi une sérologie fortement positive, ceci peut être expliqué par un effet gène-dose. La prévalence de l'allèle HLA -DQ8 dans la population générale varie géographiquement avec des taux plus élevés chez les personnes originaires du Moyen- Orient et du Sud de l'Amérique [70].

Par ailleurs, la présence simultanée des 2 allèles DQ2 et DQ8 (DQ2/DQ8) est significativement élevée chez les malades par rapport aux témoins : 13,89% vs 1,37% (OR=11,61 ; $p=3,5.10^{-3}$).

Ces résultats sont similaires aux travaux qui démontrent le rôle des hétérodimères HLA DQ2/DQ8 dans la survenue de la MC.

En effet, Le risque le plus élevé est observé chez les personnes hétérozygotes qui héritent à la fois de DQ8 et DQ2 ; avec une prévalence globale de transmettre à la fois DQ8 et DQ2 est faible à 2,5%. De plus, il est à noter que l'homozygotie DQ8 confère un risque accru par rapport à DQ8 hétérozygote [31].

Haplotype HLA DRB1-DQB1

L'analyse des haplotypes HLA DRB1-DQB1 montre une augmentation significative de la fréquence de l'haplotypes HLA DR17/DQ2 (HLA DQ 2.5) chez les patients cœliaque 41,67% par rapport aux témoins 13,7% (OR=5,079 ; $p=3.10^{-4}$), et l'haplotype DR7/DQ2 (HLA DQ 2.2) 16,11% vs 5,48% (OR=3,45 ; $p=2,85.10^{-2}$).

Ceci démontre que la susceptibilité à la MC est conférée par les deux haplotypes, parce qu'ils lient un plus large répertoire de peptides de gluten comparé aux haplotypes HLA DR4 DQ8 (HLA DQ8) ceci rejoint les travaux de (Boudjemaa, 2005 et Djender SN, Lounici A, 2010) [62 ; 61].

Cependant, l'haplotypes HLA DR4/DQ8 (HLA DQ8) n'est pas significativement augmentés chez les patients 11,11% par rapport aux témoins 6,84 (OR= 2,59 ; p=0,165). Les résultats de notre travail confirment le rôle majeur de hétérodimériser HLA DQ2 DQ8 dans la survenue de la MC chez les patients Algériennes étudiés, l'hétérogénéité génétique de cette affection reflète celle des peptides immunogènes.

Au terme de cette partie, il apparaît que la susceptibilité à la MC gènes HLA de classe II est apportée en premier lieu par l'allèle HLA DQ2, puis par l'allèle HLA DQ8. L'association avec DR3(DR17) pourrait être l'effet de déséquilibre de liaison avec l'allèle HLA DQ2.

Etude des Auto-anticorps

Anticorps anti-transglutaminase (AATGt)

Sur les 36 patients, nous avons noté que 17 des patients ont eu sérologie positive pour les AATGt. La production d'autoanticorps au cours de la MC serait secondaire à la reconnaissance par le système immunitaire de la transglutaminase complexée à la gliadine, induisant des anticorps (Ac) spécifiques de la maladie [45].

Les résultats négatifs des anticorps anti-transglutaminase n'éliminent pas la maladie cœliaque, en effet devant des signes évocateurs le diagnostic de la maladie cœliaque doit être réévalué.

Distribution des allèles HLA II en fonction des anticorps anti transglutaminase

L'analyse croisée du polymorphisme HLA DQB1 en fonction des anticorps anti transglutaminas montre que la majorité de nos patients séropositif présentent le génotype HLA DQB1*02 (DQ2) avec un pourcentage de 94,12%.

La fréquence haplotypique HLA-DR17/DQ2 est la plus élevée chez les patients positif, L'haplotype HLA-DR4/DQ8 trouvé chez (2/17) des patients avec 11,76% et la fréquence haplotypique HLA-DR7/DQ2 égale à 17,65% (3/17) ceci démontre l'implication et l'importance des allèles HLA DQ2 et HLA DQ8 dans la maladie cœliaque,

Une caractéristique de la maladie cœliaque est la présence d'auto-anticorps anti-tTG2, qui peuvent être détectés dans le sérum par la méthode immuno-enzymatique ELISA [74]. Les anticorps anti- tTG2 (en particulier IgA) sont très sensibles et spécifiques de cette maladie.

Cependant, une récente étude a fourni des preuves en faveur de la formation d'anticorps anti-tTG2 par une voie dépendante des lymphocytes T dans la maladie cœliaque et qui suggère que les lymphocytes B spécifiques de tTG2 agissent comme CPA pour les lymphocytes T spécifiques du gluten [71].

D'autres études suggèrent que les auto- anticorps peuvent également moduler la biologie de l'intestin grêle en améliorant le passage des peptides de gliadine au niveau de l'épithélium intestinal, en inhibant l'angiogenèse, ou en modifiant l'activité de tTG2, bien qu'il y ait des données contradictoires quant à savoir si l'activité de tTG2 est inhibée ou améliorée [72-73].

Tous ces études confirme le rôle de la tTG 2 dans la MC et explique l'apparition des auto-anticorps anti transglutaminase dans le sérum des patients, il explique également nos résultats qui concerne le lien entre les allèles HLA DR DQ et les auto-anticorps.

Dans ce chapitre nous présenterons les résultats qui concerne 36 patients cœliaque, en comparaison à une population de 73 sujets sains, sont tout d'origine algérien. Pour étudié la susceptibilité génétique de la maladie cœliaque et rechercher une éventuelle association entre les allèles HLA DR-DQ et les auto-anticorps retrouvés dans cette maladie.

1. Caractéristiques démographiques

1.1. Répartition des patients selon le sexe

La population de patients atteint de la MC ($n=36$) est composée de : **72,2%** des sujet de sexe féminin ($26/36$) et **27,8%** de sexe masculine ($10/36$). Le sexe ratio définit par le rapport entre le nombre de sujets de sexe féminins sur celui de sexe masculine est égale à **2,6 (F/H)** (Figure 8).

La population de témoins sains ($n=73$) est composée de : **67%** femmes ($49/73$) et de **33%** d'hommes ($24/73$).le sexe ratio est de **2 (F/H)**.

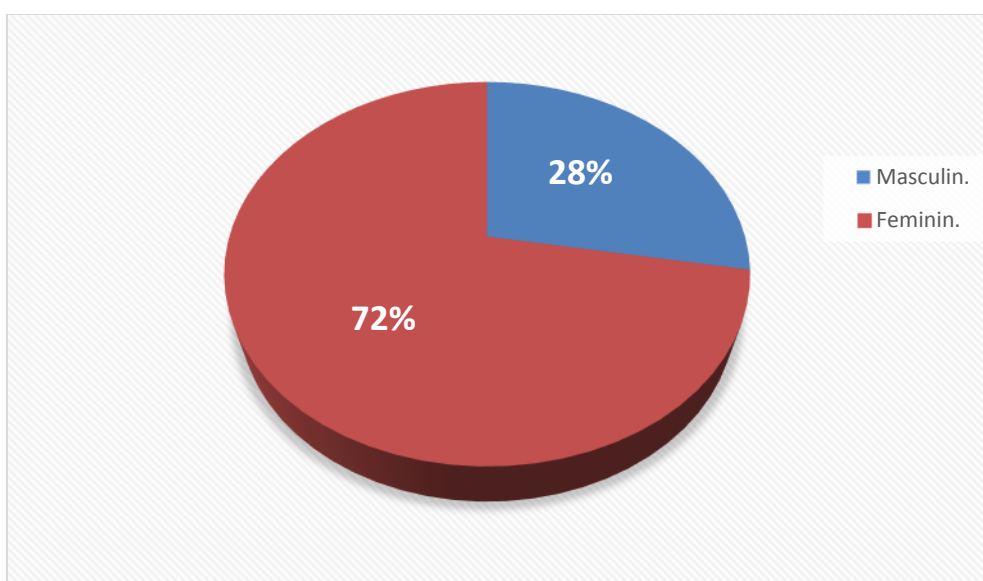


Figure 8 : Répartition des patients selon le sexe.

1.2. Répartition des patients selon l'âge

Nous avons reparti nos patients selon 6 tranches d'âge allant de 0 à 62ans (Figure 9). La moyenne d'âge est de $\pm 25,67$ ans avec une distribution comprise entre [1mois - 62ans]. Le résultat montre un taux de 22,22% chez les enfants de [0-10[et il apparait que la maladie cœliaque se manifeste principalement chez la tranche de [22-32[avec un taux de 27,77%.

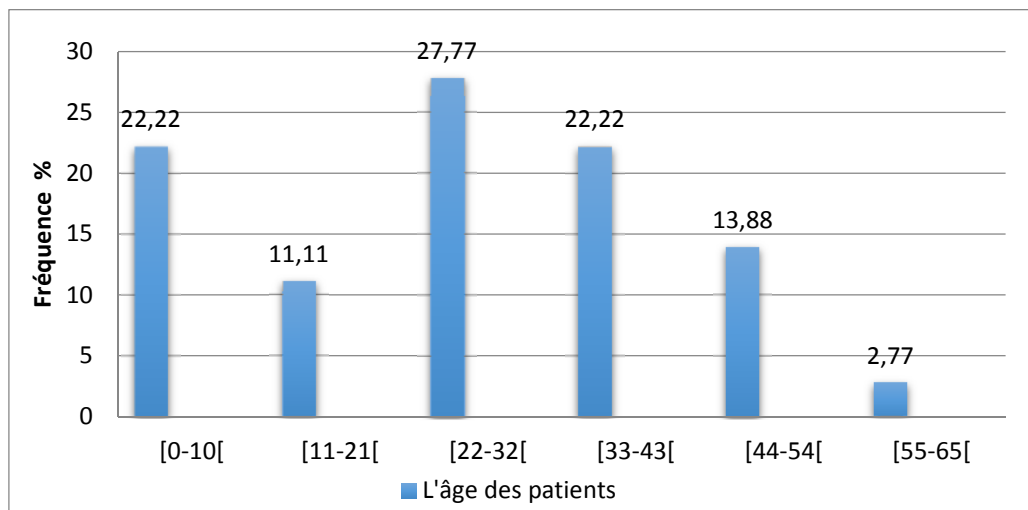


Figure 9 : Répartition des patients selon l'âge.

1.3. Répartition des patients selon le signe clinique

Dans notre série les signes cliniques les plus fréquents sont l'anémie **30%**, les signes digestifs types diarrhée chroniques **31%** et vomissement **22%**.

Etant donné que ce sont les premières conséquences de la malabsorption intestinale, et il y'a d'autre signes cliniques comme les cholestases, ostéoporose, thyroïdite et alopecie qui représente **17%** (Figure 10).

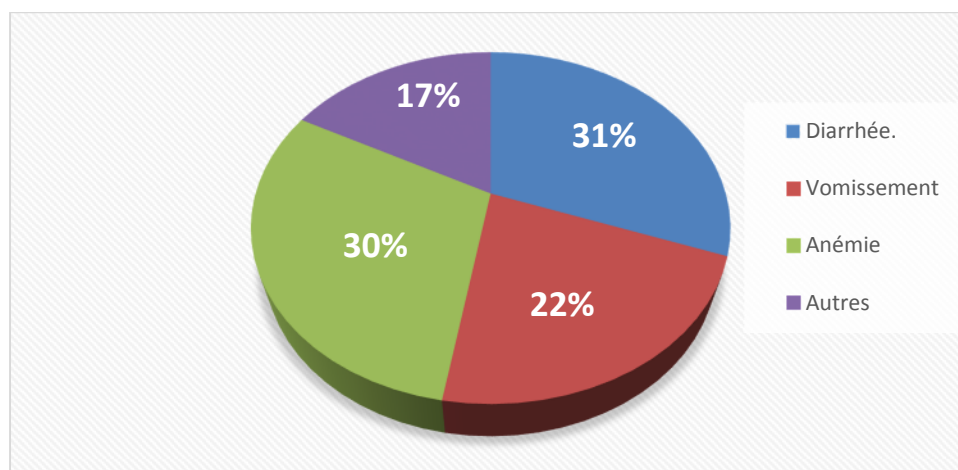


Figure 10 : Répartition des patients selon le signe clinique.

2. Fréquence des allèles HLA DRB1- DQB1

2.1. La fréquence des phénotypes HLA DQB1

A travers l'échantillon étudié de 36 patients Algériens (figure 11) , 77,77 % (28/36) portent un phénotype DQ2 et/ou DQ8 dont 69,4% (25/36) présentent le phénotype HLA DQ2 contre 41,1% retrouvé chez les témoins ce qui montre une augmentation significative de la fréquence de ce phénotype dans la population de cœliaque ($OR=3,26$; $p=2,7.10^{-3}$), et 22,2 (8/36) présentent le phénotype HLA DQ8 contre 13,7% des témoins ce qui montre une fréquence non significative ($OR=1,8$; $p= 0,129$) (Figure 11 ; Tableau IX de l'Annexe 2). Tandis que 8 patients (22,2%) se sont révélés être de phénotype DQ2-DQ8 négatif.

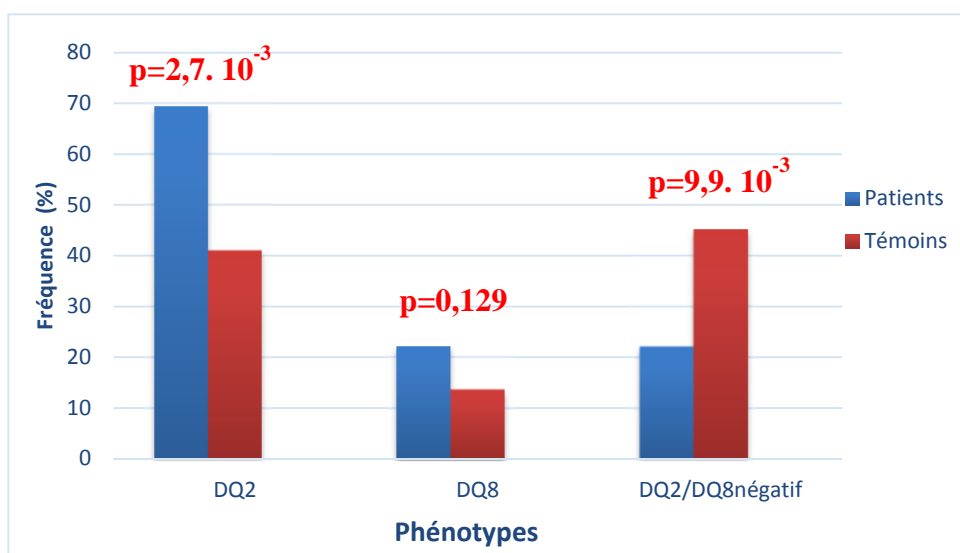


Figure11 : Fréquence phénotypique des allèles DQB1.

2.2. La fréquence des allèles HLA DQB1*

Le polymorphisme HLA DQB1 a montré une augmentation significative de la fréquence des allèles HLA DQB1*02 (DQ2) et DQB1*0302 (DQ8) chez les patients par rapport aux témoins, respectivement de 45,83% vs 24,66% (OR=6,94 ; $p < 0,0001$) et de 12,5% vs 8,22% (OR=3,19 ; $p = 1,99.10^{-2}$) (Figure 12 ; Tableau X de l'Annexe 2).

La fréquence de l'allèle HLA DQB1*06 (DQ6) est nettement plus importante chez les témoins par rapport aux patients avec des fréquences respectives de 23,29 % vs 6,94%, cette différence est significative (OR=0,3 ; $p = 2,89.10^{-2}$).

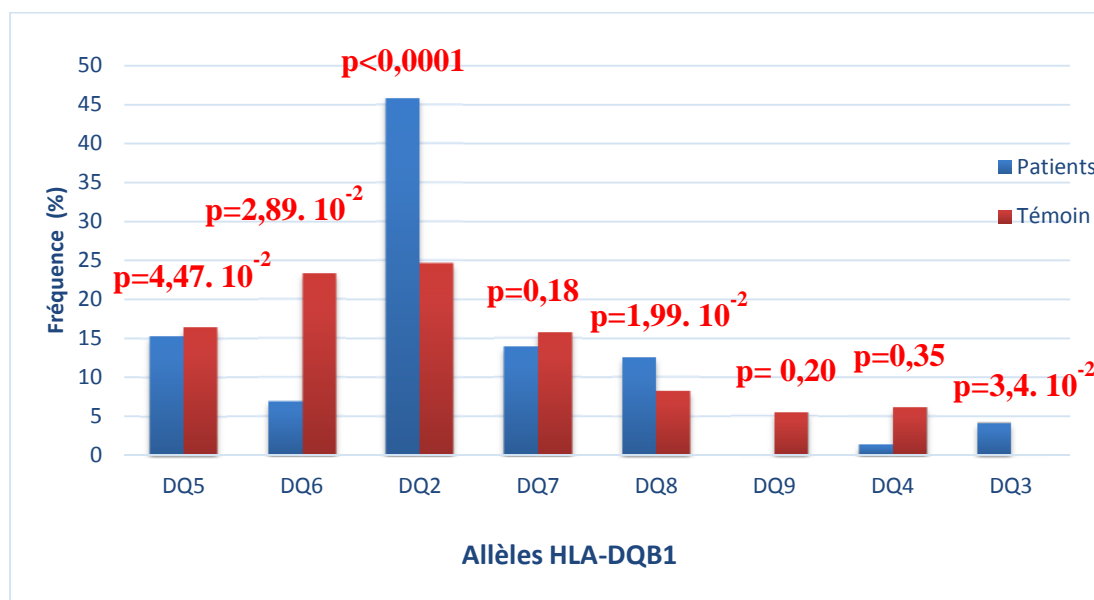


Figure 12 : Fréquence des allèles HLA DQB1*.

2.3. Fréquence des allèles HLA DRB1*

Selon les résultats représentés sur l'histogramme, l'exploration du polymorphisme HLA DR montre que la majorité de nos patients présentent l'allèle HLA DRB1*03 (DR17) à 30,46% significativement plus élevé que chez les témoins 15,07%, (OR=2,48 ; $p= 2,5.10^{-2}$) (Figure 13 ; Tableau XI de l'Annexe 2).

En revanche les allèles les plus fréquents chez les témoins avec des fréquences plus élevées à celle des malades ; HLA-DR13 (6) chez les témoins noté à 10,27% contre 8,33% chez les patients, (OR=0,332 ; $p=7,4.10^{-2}$) ainsi la fréquence phénotypique de l'HLA-DR4 à 17,81% contre 11,11% des témoins.

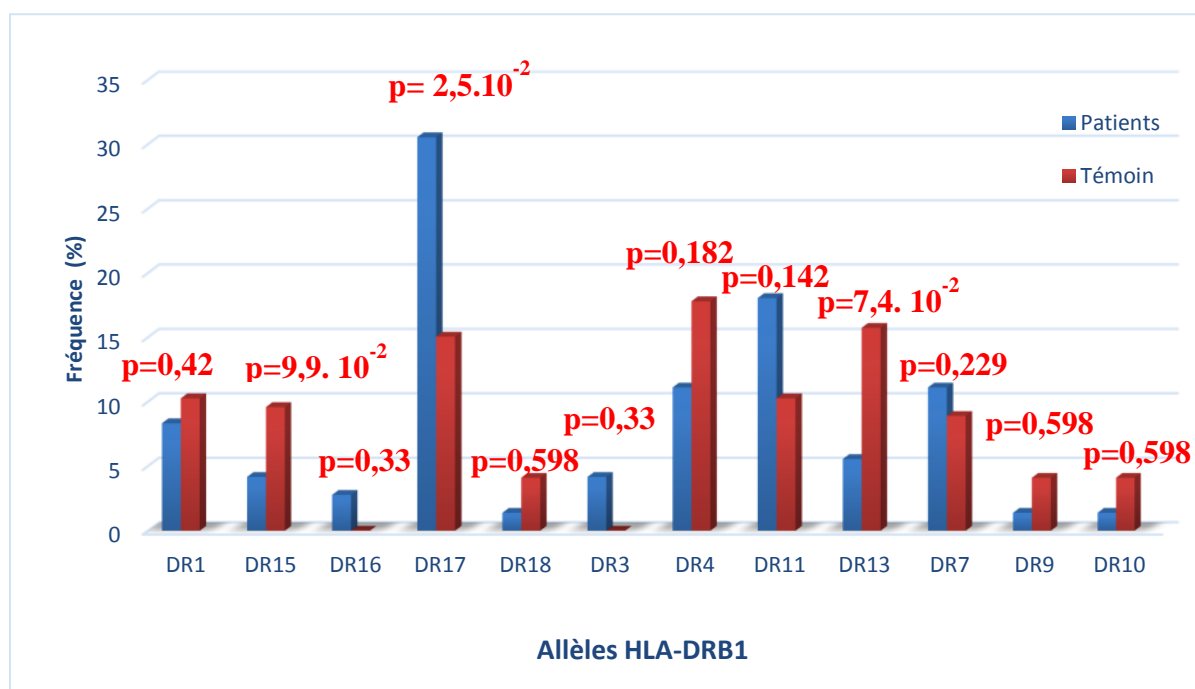


Figure 13 : Fréquence des allèles HLA DRB1.

2.4. Fréquence de l'homozygotie et de l'hétérozygotie des allèles HLA DQB1*

D'après les résultats (figure 14) obtenus nous constatons que l'allèle HLA DQ2 en double dose (DQ2/DQ2) est plus augmenté chez les patients cœliaque 22,22% que chez les témoins 6,84% (OR=4,929 ; $p=4,3.10^{-3}$) (Figure 14 ; Tableau XII de l'Annexe 2).

L'allèle DQ8 en double dose (DQ8/DQ8) n'est pas significativement augmenté chez les patients par rapport aux témoins 1,39% vs 1,37% ($p=0,55$).

Par ailleurs, la présence simultanée des 2 allèles DQ2 et DQ8 (DQ2/DQ8) est significativement augmentée chez les malades par rapport aux témoins : 13,89% vs 1,37% (OR=11,61 ; $p=3,5.10^{-3}$).

X : étant n'importe quel allèle autre que DQ2 et DQ8

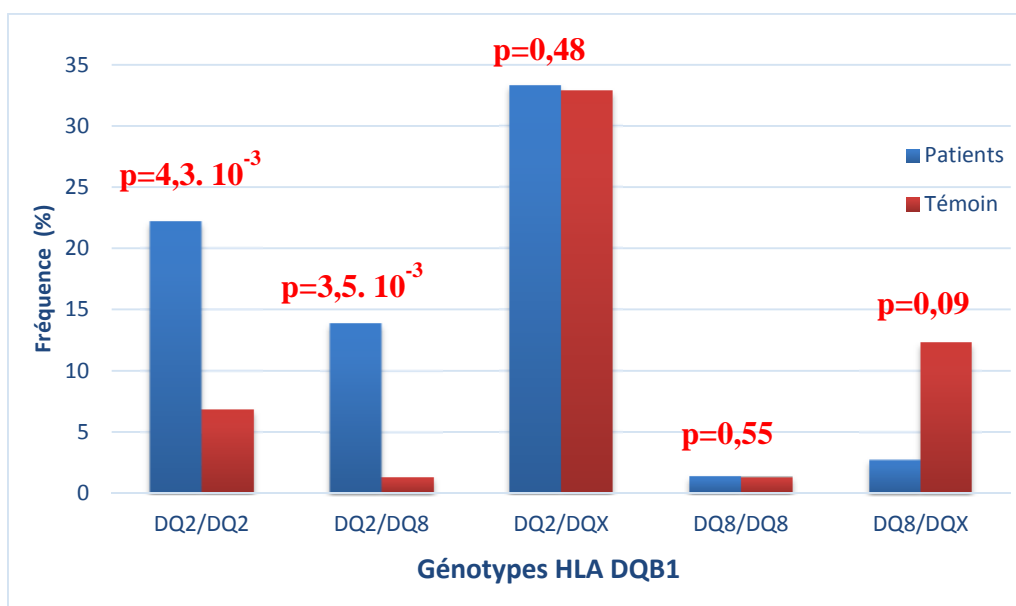


Figure 14 : Fréquence de l'homozygotie et de l'hétérozygotie des allèles HLA DQB1*.

2.5. Fréquence des haplotypes HLA DRB1*-DQB1*

L'analyse des haplotypes HLA DRB1*-DQB1* a montré une augmentation significative de la fréquence de l'haplotypes HLA DR17/DQ2 (HLA DQ 2.5) chez les patients cœliaque 41,67% par rapport aux témoins 13,7% (OR=5,079 ; $p=3.10^{-4}$), et l'haplotype DR7/DQ2 (HLA DQ 2.2) 16,11% vs 5,48% (OR=3,45 ; $p=2,85.10^{-2}$) (Figure 15 ; Tableau XIII de l'Annexe 2).

Cependant, l'haplotypes HLA DR4/DQ8 (HLA DQ8) n'est pas significativement augmentés chez les patients 11,11% par rapport aux témoins 6,84 (OR= 1,7 ; $p=0,224$).

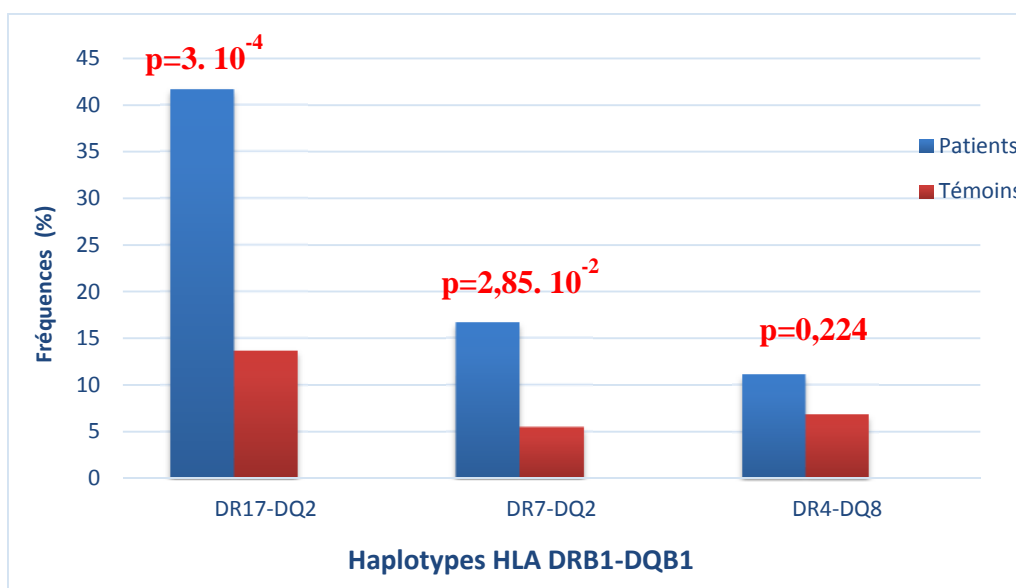


Figure 15 : Fréquence des haplotypes HLA DRB1*-DQB1*.

3. Résultats de la recherche des Auto-anticorps

3.1. Fréquence des anticorps anti-transglutaminase (IgA)

Sur 36 patients MC 17 sont positive pour les anticorps anti-transglutaminase (47,22%), ces auto-anticorps sont absences chez témoins (OR= 131.9, $p < 0,001$) (Figure 16 ; Tableau XIV de l'Annexe 2)

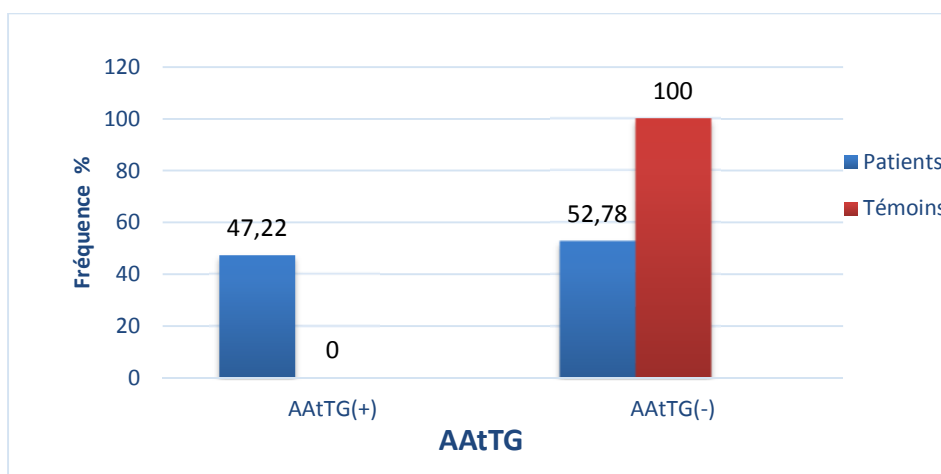


Figure 16 : Fréquence des anticorps anti-transglutaminase.

4. Etude croisée des allèles HLA DQB1* en fonction des auto-anticorps (TGt)

4.1. Fréquence des allèles HLA DQB1* en fonction des auto-anticorps (TGt)

94,12% des patients AAtTG (+) sont HLA DQB1*02, et la fréquence de l'allèle HLA DQB1* 05 (QD5) est plus important que la fréquence de l'allèle HLA DQB1*08 (DQ8) avec des fréquences respective 35,29 vs 23,52 (Figure 17 ; Tableau XV de l'Annexe 2)

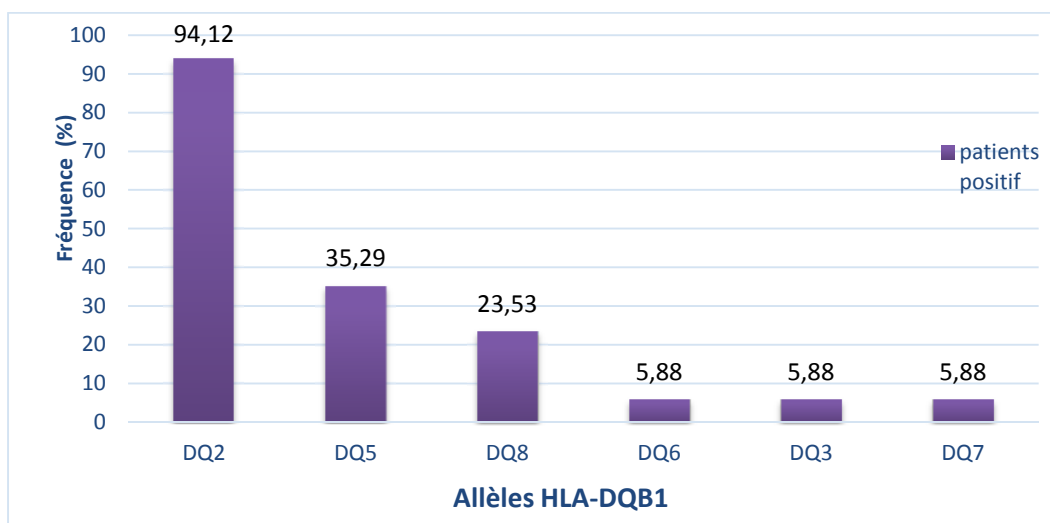


Figure 17 : Fréquence des allèles HLA DQB1* en fonction des AAtTG.

4.2 .Fréquence des allèles HLA DRB1*en fonction des auto-anticorps (TGt)

Sur 17 patients, 70,59% sont HLA DR17 (HLA-DR B1*03) et 23,53% sont HLA-DR4 (Figure 18 ; Tableau XVI de l’Annexe 2).

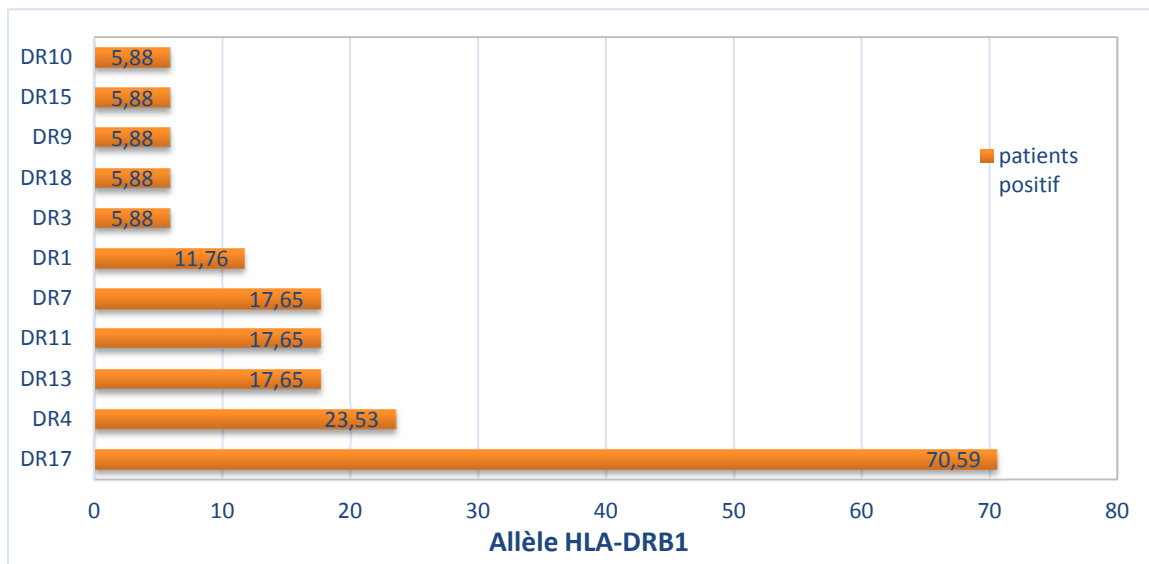


Figure 18 : Fréquence des allèles HLA DRB1*en fonction des AAtTG.

4.3. Fréquence de l’homozygotie et de l’hétérozygotie des allèles HLA DQB1*en fonction des auto-anticorps (TGt)

L’hétérozygotie DQ2/DQ5 est plus fréquente (35,29%) comparaison l’homozygotie DQ2/DQ2 (29,41%).

La forme HLA-DQ2/HLA-DQ8 est observée dans (17,65%) (Figure 19 ; Tableau XVII de l’Annexe 2).

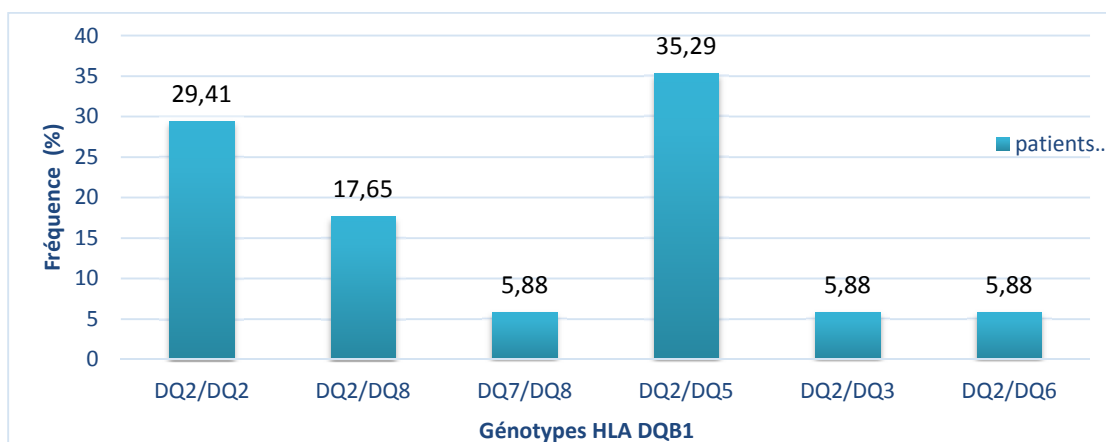


Figure 19 : Fréquence de l’homozygotie et de l’hétérozygotie des allèles HLA DQB1*en fonction des AAtTG.

4.4. Fréquence des haplotypes HLA DRB1*-DQB1* en fonction des auto-anticorps

(TGt)

L'haplotype HLA-DR17/DQ2 est plus fréquent chez les patients positif 12/17 (70,59%) (Figure 20 ; Tableau XVIII de l'Annexe 2).

L'haplotype HLA-DR4/DQ8 (2/17) et HLA-DR7/DQ2 (3/17) est égale respectivement (11,76%) et (17,65%).

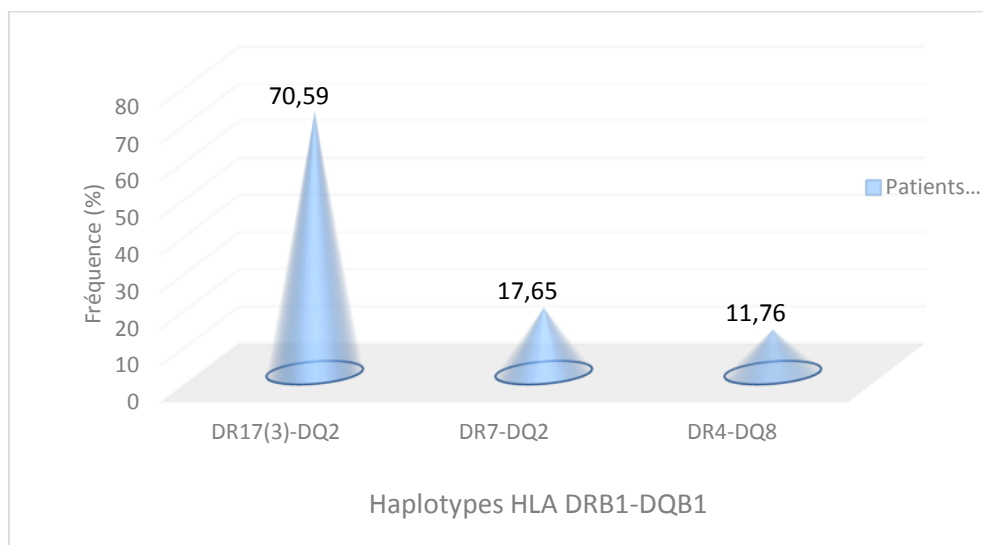


Figure 20 : Fréquence des haplotypes HLA DRB1*-DQB1* en fonction des AAtTG.