

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

FACULTE DES SCIENCES AGRONOMIQUES ET BIOLOGIQUES

MEMOIRE DE PROJET DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
DE MASTER EN SNV

Option : Génétique et physiologie

THEME

**Etude de polymorphisme
des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)**

Présenté par:

Mr **KHALI Hichem Abdelkader**

Soutenu publiquement le 24/ 09/ 2013

Devant le jury:

Mme SAADIL	MCB	USDB	Présidente
Mme AISSANI.R	MAA	USDB	Examinatrice
Mme ANANE.A	MAA	USDB	Examinatrice
Mme GUESSAIBIA.N	MCB	USDB	Promotrice
Mr BENAMER.M	Professeur	CHU Mustapha	Co-promoteur

Promotion 2012 -2013

Liste des tableaux

<u>Tableau 01:</u> Différence entre la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique.....	4
<u>Tableau 02:</u> Eléments du diagnostic différentiel entre maladie de Crohn et RCH.....	9
<u>Tableau 03:</u> le programme d'amplification.....	32
<u>Tableau 04:</u> Interprétation des résultats.....	33
<u>Tableau 05:</u> répartition des patients atteints de MICI selon le sexe.....	34
<u>Tableau 06:</u> répartition des patients atteints de la maladie de Crohn par tranche d'âge....	35
<u>Tableau 07:</u> Moyenne d'âge des patients atteints de la Maladie de Crohn.....	36
<u>Tableau 08:</u> Répartition des patients atteints de RCH par classes d'âge.....	36
<u>Tableau 09:</u> Moyenne d'âge des patients atteints de la RCH	37
<u>Tableau 10:</u> concentration des ADN des Patients.....	41
<u>Tableau 11:</u> Fréquence des allèles HLADR B1* et HLADQB1* chez les patients MC et les témoins.....	43

Liste des figures :

<u>Figure 01:</u> Représentation des pathologies reprises sous le terme de MICI.....	intro
<u>Figure 02:</u> Principales différences entre la maladie de Crohn et la RCH.....	3
<u>Figure 03 :</u> lésion histologique d'une RCH.....	7
<u>Figure 04:</u> manifestation extra-intestinale.....	10
<u>Figure 05:</u> l'impact des facteurs environnementaux sur la pathogénèse des MICI.....	12
<u>Figure 06:</u> Structure du gène et de la protéine NOD2/CARD15.....	14
<u>Figure 07:</u> maintien de l'homéostasie intestinale et mécanisme de reconnaissance bactérienne par les cellules épithéliales intestinales	18
<u>Figure 08 :</u> Immunopathogénèse de la MC.....	20
<u>Figure 09 :</u> Structure du système HLA.....	23
<u>Figure 10:</u> les différentes étapes de la PCR.....	28
<u>Figure 11:</u> A, B, C : principes de la PCR-SSP.....	30
<u>Figure 12:</u> préparation des plaques à PCR.....	31
<u>Figure 13 :</u> Les différents cibles des gènes HLA classe II (DQB1 et DRB1).....	32
<u>Figure 14:</u> répartition des patients atteints de MICI selon le sexe.....	34
<u>Figure 15:</u> répartition de la maladie de Crohn par tranche d'âge.....	35
<u>Figure 16:</u> Répartition des patients atteints de RCH par classes d'âge.....	37
<u>Figure 17 :</u> schéma qui illustre la tendance des formes familiales.....	38
<u>Figure 18:</u> arbres généalogiques des familles atteintes de la forme familiale de MICI	41
<u>Figure 19:</u> Contrôle de la PCR-SSP sur gel d'agarose.....	42
<u>Figure 20:</u> Comparaison des fréquences des allèles HLA DQ B1* chez les patients MC et les témoins.....	44
<u>Figure 21:</u> Comparaison des fréquences des allèles HLA DR B1* chez les patients MC et les témoins.....	44

Résumé:

Les Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales (MICI) sont des affections caractérisées par une inflammation chronique de l'intestin. Elles sont représentées principalement par la maladie de Crohn (MC) et la recto-colite-hémorragique (RCH).

L'association des MICI avec les gènes HLA a été étudiée dans différents groupes ethniques. Notre étude s'est intéressée à évaluer la distribution et l'implication des gènes HLA de classe II (DR et DQ) chez des patients atteints de MICI.

190 dossiers de patients atteints de MICI ont été étudiés dans lesquels ont été décelés 11 (5,80%) cas de forme familiale. Ces patients étaient majoritairement des hommes 57% ayant en moyenne 31,8 ans pour ceux atteints de la MC et 33,1 pour ceux atteints de la RCH. Les femmes étaient moins représentées 43%.

Le typage HLA a concerné les variant alléliques HLA-DRB1* (de 01 à 16) et HLA-DQB1 (de 02 à 06). Seuls 19 patients ont accepté d'être soumis à ce test de typage HLA. L'analyse de la fréquence allélique du polymorphisme HLA-DQB1* montre une différence significative de l'allèle HLA-DQB1*02 entre les malades par rapport aux témoins et celle du polymorphisme HLA-DRB1* montre une fréquence élevée de l'allèle HLA-DRB1*13 des malades par rapport aux témoins.

Cette étude nous révèle qu'il serait important de procéder à la généralisation de la technique du typage HLA dans les populations à risque pour une meilleure prévention contre les MICI.

Mots clés : Maladies inflammatoire chronique intestinales (MICI) , RCH, MC, typage HLA.

Abstract

Inflammatory Bowel Disease (IBD) are diseases characterized by chronic inflammation of the intestine. They are mainly represented by Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis, colitis (UC).

The association of IBD with HLA genes has been studied in different ethnic groups. Our study was interested in assessing the distribution and involvement of HLA class II (DR and DQ) in patients with IBD.

190 records of patients with IBD were studied in which were found 11 (5.80%) cases of familial form. These patients were predominantly men 57% with an average of 31.8 years for those with CD and 33.1 for those Reach UC. Women were less represented 43%. HLA concerned the variant allele HLA-DRB1* (01 to 16) and HLA-DQB1 (February to June). Only 19 patients agreed to be subjected to this test HLA typing. Analysis of the allelic frequency of HLA-DQB1 * polymorphism showed a significant difference in HLA-DQB1 * 02 among patients compared with controls and the polymorphism HLA-DRB1 * shows a high frequency of HLA-DRB1* 13 patients compared to controls.

This study reveals that it would be important to generalize the technique of HLA typing in populations at risk for Prevention against IBD.

Keywords: chronic inflammatory bowel diseases (IBD), ulcerative colitis, MC, HLA typing.

ملخص :

مرض التهاب الأمعاء (MUCI) هي الأمراض التي تتميز التهاب مزمن في الأمعاء. إنها تتمثل أساسا من مرض كرون (CD) والتهاب القولون التقرحي، التهاب القولون (UC). وقد درس رابطة MUCI مع جينات HLA في مجموعات عرقية مختلفة.

كان دراستنا المهتمين في تقييم التوزيع وإشراك فئة HLA II DR وDQ في المرضى الذين يعانون من مرض التهاب الأمعاء .

تمت دراسة 190 سجلات المرضى الذين يعانون من مرض التهاب الأمعاء التي تم العثور 5.80 11٪ (حالات النموذج العائلي). كان هؤلاء المرضى في الغالب الرجال 57٪ بمتوسط 31.8 عاما بالنسبة لأولئك مع CD و 33.1 بالنسبة لأولئك الوصول UC. وأقل تمثيل المرأة 43٪ .

HLA المعنية البديل أليل (01-16) * (HLA-DRB1 و) HLA-DQB1 فبراير حتى يونيو. (اتفق المرضى 19 إلا أن تخضع لهذا الاختبار الكتابة .

تحليل HLA الترددات أليلية من * HLA-DQB1 أظهر تعدد الأشكال اختلاف كبير في HLA-DQB1*02 بين المرضى مقارنة مع الضوابط وتعدد الأشكال * HLA-DRB1 يظهر ارتفاع وتيرة HLA-DRB1*13 مريضا مقارنة مع الضوابط.

يكشف هذه الدراسة أنه سيكون من المهم أن تعميم أسلوب الكتابة HLA في السكان المعرضين للخطر لمنع ضد مرض التهاب الأمعاء .

الكلمات الرئيسية: أمراض الأمعاء الالتهابية المزمنة (MUCI)، والتهاب القولون التقرحي، MC، HLA الكتابة .

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Résumé

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste d'abréviation

Glossaire

Introduction

Chapitre I : synthèse bibliographique

I.1.Historique	1
I.2.Epidémiologie	1
I.3.Présentation des MICI	3
I.4.Aspect cliniques	5
I.4.1. Rectocolite hémorragique.....	5
I.4.2 Maladie de Crohn.....	6
I.5. Eléments de diagnostic.....	7
I.5.1.La maladie de RCH	7
I.5.1.1.Endoscopie	7
I.5.1.2.Les examens radiologiques.....	7
I.5.1.3.Les lésions histologiques.....	7
I.5.1.4.Les signes biologiques.....	8
I.5.2. La maladie de Crohn.....	8
I.5.2.1.Endoscopie	8
I.5.2.2.Sur le plan biologique	8
I.5.2.3. Sur le plan sérologique.....	9
I.6.Manifestations extra-intestinales.....	10
I.7.Forme familiale des MICI.....	11
I.7.1. Les facteurs génétiques	11
I.7.2. Les facteurs environnementaux	12
I.7.3. Gènes de prédisposition.....	13
I.7.4. Le gène NOD2 / CARD15.....	13

I.7.4.1 Localisation chromosomique et structure.....	14
I.7.4.2. Ligand de la protéine NOD2.....	15
I.7.4.3 Fonction de la protéine NOD2.....	16
I.7.4.4 Polymorphismes de NOD2.....	19
I.7.4.5 Effets des mutations NOD2.....	20
I.7.5. Facteurs immunologiques.....	20
I.7.5.1. Immunopathogénèse de la Maladie de Crohn.....	20
I.8. le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).....	21
I.8.1. Propriétés génétiques.....	21
I.8.2. Nomenclature.....	21
I.8.3. Les caractéristiques du système HLA.....	22
I.8.3.1. Polymorphisme extrême.....	22
I.8.3.2. Transmission autosomale codominante.....	22
I.8.3.3 Liaison étroite.....	22

Chapitre II : Matériels et méthodes

II-1- matériels.....	24
II.1.1 mode de recrutement.....	24
II.2.Echantillons.....	24
II.3. Méthodes.....	24
II.3.1.Etude statistique.....	24
II.3.2. Etude moléculaire.....	25
II.3.2.1.Extraction de l'ADN génomique.....	25
II.3.2.2.PCR.....	26
II.3.2.2.1. Amplification de l'ADN génomique par PCR.....	26
II.3.2.3. Dosage de l'ADN par Spectrophotométrie.....	29
II.3.2.4.Typage générique HLA classe II par PCR-SSP.....	29
II.3.2.4.1.Mode opératoire.....	31
II.3.2.4.3. Interprétation des résultats.....	33

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1.résultats.....	34
III.1.1.L'ensemble des MICI recueils.....	34
III.1.2.Repartition globale des patients atteints de MICI selon le sexe.....	34
III.1.3. Répartition des patients atteints de MICI par tranche d'âge.....	35
III.1.3.1 Répartition des patients atteints de la maladie de Crohn par tranche d'âge.....	35
III.1.3.2. Répartition des patients atteints de RCH par tranche d'âge.....	36
III.1.4 Répartition des formes familiales des MICI.....	37
III.1.4.1. les arbres généalogiques des formes familiales.....	38
III.1.4.1.1. maladie de crohn.....	38
III.1.4.1.2.recto-colite-hémorragique.....	39
III.1.5. Etude moléculaire.....	40
III.1.5.1. Résultats de la biologie moléculaire.....	40
III.1.5.2.Typage générique des allèles HLA DRB1* et DQB1*.....	43
III.2.Discussion.....	45
Conclusion.....	48
Référence bibliographique	
Annexe	

INTRODUCTION

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) représentent un groupe de maladies idiopathiques caractérisées par une inflammation chronique de l'intestin. Ce groupe correspond à deux grandes affections: la Maladie de Crohn (MC) et la Recto-Colite-Hémorragique (RCH). Ces deux affections comportent des caractéristiques cliniques et pathologiques distinctes mais il existe également un certain chevauchement. (Chamberlin et al., 2006)

Une troisième entité peut être ajoutée, la « colite indéterminée », présentant les caractéristiques d'une colite idiopathique pour laquelle l'ensemble des examens réalisés ne permet pas de trancher entre maladie de Crohn et recto-colite. (Figure 1)

La pathogénèse des MICI n'est que partiellement connue à ce jour. Des facteurs génétiques et environnementaux tels qu'une modification de la flore bactérienne intra-luminale et une perméabilité intestinale accrue jouent un rôle dans la dérégulation de l'immunité intestinale, avec pour effet des lésions gastro-intestinales.

Les maladies inflammatoires de l'intestin sont des maladies très peu connues. Sur le plan génétique, ce sont des maladies complexes, puisqu'elles ne suivent pas les lois de la ségrégation mendélienne. Elles semblent associées à une combinaison de gènes ou à leur action conjuguée. D'ailleurs, plusieurs gènes sont aujourd'hui associés aux maladies inflammatoires de l'intestin. (Duerr et al., 2006)

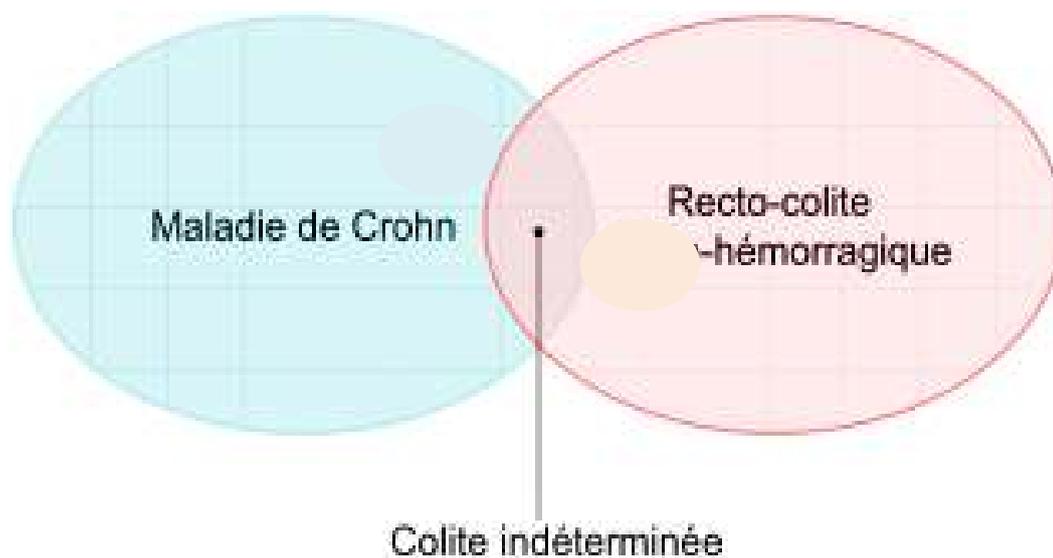


Figure 01: Représentation des pathologies reprises sous le terme de MICI. (Jones, D.T et al 2008)

I.1.HISTORIQUE

Les maladies inflammatoires intestinales affectent très certainement l'être humain depuis des siècles. Certaines descriptions anatomo-cliniques remontant à l'Antiquité sont compatibles avec le diagnostic de MICI. Elles ont été décrites dès le deuxième siècle après J-C. par les médecins grecs Soranus et Aretaeus de Cappadocia. En 870, le roi Alfred d'Angleterre (849 -901) souffrait de douleurs abdominales, de malaises et de diarrhées chroniques, attribués à l'époque à de la sorcellerie ou au châtement divin suite à ses infidélités, mais probablement dus à une MICI. En 1612, l'autopsie d'un jeune garçon rapporte des ulcérations intestinales semblables à celles présentes dans les MICI (**Fielding, 1988**). En 1913 le Docteur T.K. Dalziel publie le résultat d'autopsie de 13 patients souffrant d'obstruction intestinale. Tous les patients présentaient une inflammation intestinale transmurale, caractéristique de la maladie de Crohn(**Dalziel, 1989**).

La maladie de Crohn (MC) a été décrite en 1932 dans « Journal of the American Medical Association » par les Docteurs B. Crohn, L. Ginsberg et G.D. Oppenheimer comme iléite terminale (atteignant l'iléon). L'extension des lésions à d'autres segments du tube digestif a ensuite été rapportée et le nom de maladie de Crohn attribué à cette pathologie.

Concernant la recto-colite ulcéro-hémorragique (RCH) ; le premier cas de cette pathologie fut rapporté par Sir S. Wilks dans « London Medical Times and Gazette» en 1859 suite à l'autopsie d'une jeune femme, Isabella, dont le décès avait été attribué à un empoisonnement. En 1875, Wilks et Moxon furent les premiers à la présenter comme pathologie non infectieuse (**Wilks S, 1875**).

I.2.EPIDEMIOLOGIE

Les MICI affectent 2,5 millions de personnes dans le monde dont 200 000 en France. Sur ces 200 000 personnes, environ 120 000 sont atteintes de la maladie de Crohn et 80 000 souffrent de RCH. Par ailleurs, 5000 à 6000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année en France. Si aujourd'hui ce chiffre demeure stable, ce n'était pas le cas il y a une trentaine d'années puisqu'on estime qu'entre 1945 et 1980, l'incidence de ces maladies a été multipliée par 10 dans les pays industrialisés (**Ismail R et al ., 1997**).

La maladie de Crohn et la RCH affectent plus souvent les sujets jeunes et, dans un quart des cas, l'ensemble des symptômes apparaît avant l'âge de 25 ans. Il existe également une disparité selon le sexe du sujet et il semble que le ratio femmes sur hommes pour la maladie de Crohn soit de 0,9 tandis que celui relatif à la RCH soit de 0,5 (**Hugot J. P et al., 2001**).

Bien que les causes de ces maladies demeurent encore inconnues à ce jour, il apparaît que ces pathologies multifactorielles impliquent des facteurs environnementaux auxquels peut se rajouter le tabac sur un terrain prédisposé génétiquement. En effet, une étude réalisée sur une population représentative de jumeaux homo et hétérozygotes a permis de mettre en évidence que, pour la maladie de Crohn, le taux de concordance chez

les homozygotes (58.3 %) était significativement supérieur à celui observé chez les hétérozygotes (6.3 %). Cette découverte a donc naturellement incité les scientifiques à rechercher les gènes susceptibles d'influencer le développement des MICI. Sur ces bases, trois équipes européennes et américaines ont mis en évidence en 2001, la première gène de susceptibilité pour la maladie de Crohn. Il s'agit de gène NOD2/CARD15 (**Hampe J et al., 2001**).

Plus récemment, deux autres gènes de susceptibilité ont été identifiés sur les chromosomes 5 et 10 et nommés respectivement OCTN et DLG5. Il semblerait ainsi que les MICI fassent partie des pathologies oligogéniques (**Stoll M et al., 2004**).

En Algérie une étude épidémiologique menée entre 2003 et 2007 a révélé que l'incidence annuelle de la maladie de Crohn (pour 100000 habitants) était de 5,87%. Le pic incidence était de 21% dans la tranche d'âge des 30-39ans, Le sex-ratio F/H était de 1,11. L'ensemble des données montrent que le taux d'incidence annuel moyen de MC connaît une recrudescence situant notre pays dans la zone intermédiaire (**Hammada et al., 2011**).

I.3.PRESENTATION DES MICI

Ces maladies se rejoignent par leur caractère chronique marqué par une évolution en poussées symptomatiques de gravité variable, cédant parfois spontanément ou dans la majeure partie des cas sous traitement, entrecoupées de périodes de rémission plus ou moins longues. Certaines formes graves de MICI peuvent évoluer de manière chronique active, se manifestant par une période de poussée prolongée malgré une prise en charge thérapeutique de la pathologie (A.Cortotet *al.*,2009).

La MC et la RCH se différencient principalement par le siège de leurs lésions. En outre, dans la MC l'atteinte de la muqueuse digestive est transpariétale alors que dans la RCH l'atteinte est plus superficielle(**figure2**).

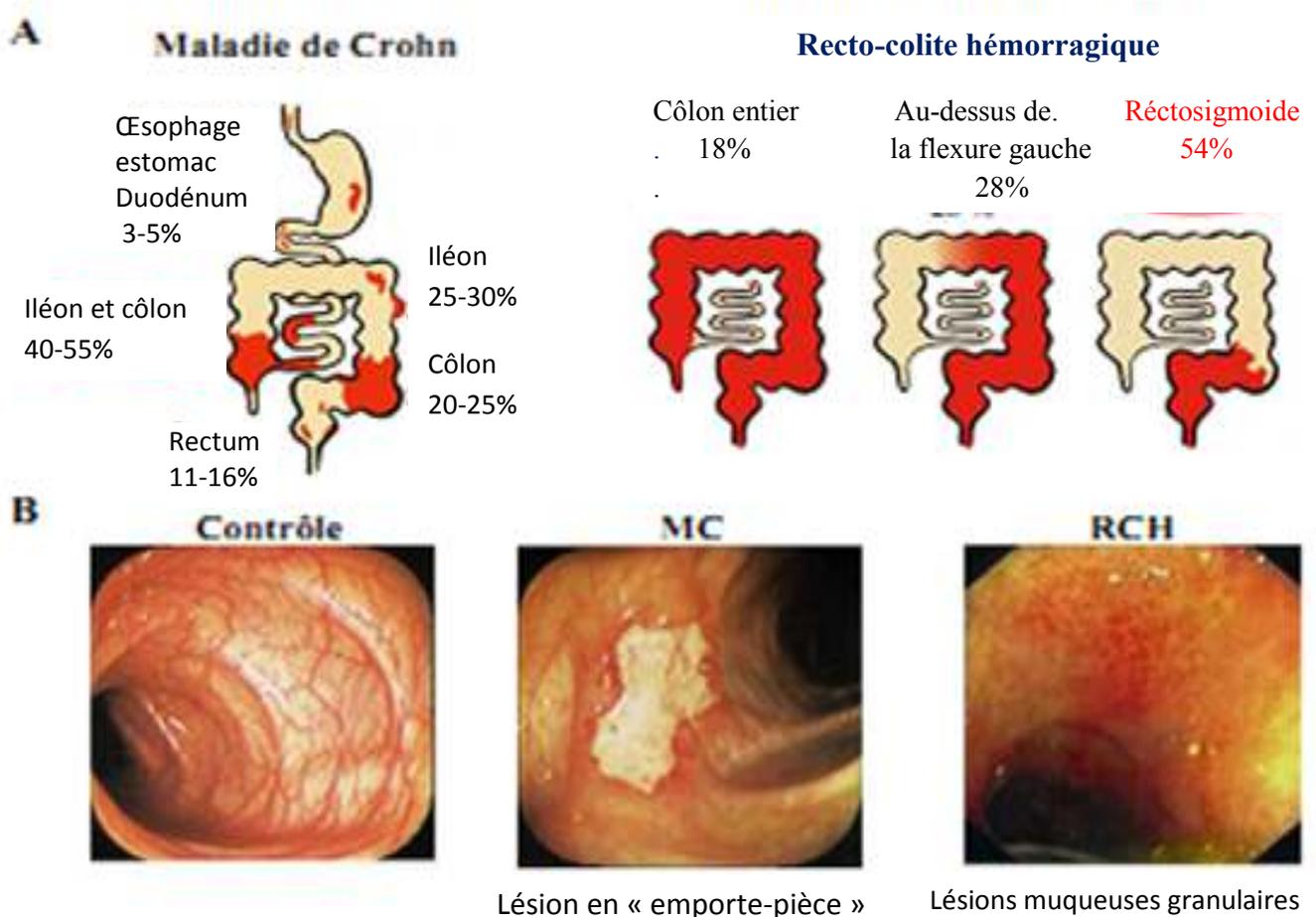


Figure 2: Principales différences entre la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique (A.Cortot et *al.*,2009)

Concernant la RCH, les lésions se présentent sous forme d'une inflammation régulière et continue, sans intervalle de zones saines. L'atteinte progresse de manière antérograde, à point de départ rectal dans 95 % des cas. Globalement, lors du diagnostic on retrouve 30 % de proctite (seul le rectum est touché), 50 % de formes colites gauches et 15 % de formes pancolites (atteinte de l'ensemble du rectum et du côlon).

Chez certains patients présentant une localisation recto-colique des lésions, un diagnostic de premier abord peut être difficile à réaliser, on parle alors de colite indéterminée (5% des cas). Seule l'évolution de la pathologie permettra de différencier une MC d'une RCH.(A.Cortotet *al.*,2009).

La MC peut toucher la totalité du tube digestif, avec une localisation préférentielle au niveau de l'iléon terminal alors que les lésions de RCH se limitent au côlon et au rectum. L'endoscopie permet parfois de distinguer les lésions dites en « emporte-pièce » indiquant une MC, des lésions continues et granulaires caractéristiques de la RCH (Tamboli, C.P et *al.*, 2004) .

Tableau 01: Différence entre la maladie de Crohn la recto-colite hémorragique (H.Hassikou, 2013)

	MALADIE DE CROHN	R.C.H.
TERRAIN	20-30 ans ; formes familiale = 10 % tabac ↗ risque	20-50 ans, 2 ♂ / 1 ♀ ; formes familiale = 5 % tabac ↘ risque
CLINIQUE TYPIQUE	Evolution par poussées fébricule, signe extra-digestives Diarrhées, douleur abdominale, FID gargouillante	Evolution par poussées Diarrhées, syndrome dysentérique, syndrome rectal, douleur FIG
ATTEINTE	De l'estomac à l'anus, discontinue , avec atteinte de la dernière anse iléale	Attente colique continue
ATTEINTE RECTALE	50%	Fréquente
ATTEINTE ANOPERINEALE	40 %	Absence

FISTULE	10-15 %	Absence
ENDOSCOPIE	Lésions homogènes, limite supérieur nette, au max pan colite Aspect granité, fragile , ulcérations, abcès cryptiques absence d'intervalle de muqueuse saine	Lésions hétérogènes Erythème en plaque, ulcérations aphthoïdes superficiels et aspect serpiginieux, sténoses Intervalle de muqueuse saine
RADIO	Chambre de dilatation, sténose	Aspect tubulé du sigmoïde , ulcérations en bouton de chemise , image double contour
HISTOLOGIE	Granulome tuberculoïde (épithélioïde, géantocell) Infiltrat lymphoplasmocytaire Mucosécrétion conservée	Absence de granulome tuberculoïde Infiltrat de PNN Mucosécrétion diminuée
COMPLICATIONS	Abcès, sténoses, fistules, occlusion	Hémorragie digestive massive, Colectasie , perforation
MEI	(± K) Extra-digestive : cutanée (aphtes), SpondiloArtrite, oculaire, hépatobiliaire (cholangite sclérosante), stérilité (sténos tubaire), SA (spondylarthrite ankylosante)	K (risque x20 à 10 ans) Extra-digestive : cutanée, oculaire, hépatobiliaire (cholangite sclérosante)

I.4.ASPECTS CLINIQUES

I.4.1. Rectocolite hémorragique

Les signes cliniques principaux sont la diarrhée, des selles glaireuses, des saignements rectaux, et des douleurs abdominales. La symptomatologie est très variée d'un individu à l'autre et selon la sévérité de l'atteinte. Certaines formes restent infra-cliniques avec des diarrhées et saignements très intermittents. Dans les formes graves les selles sont nombreuses et contiennent du sang et du pus. Le diagnostic est à faire avec les autres formes de colite
(Garnier et al.,2006)

I.4.2 Maladie de Crohn

La maladie de Crohn est une entérite segmentaire ou plurisegmentaire ulcéro-scléreuse qui peut toucher n'importe quelle partie du tube digestif, de la bouche au côlon. On parle parfois d'iléocolite granulomateuse.

Le site le plus fréquent est l'**iléon**, avec des douleurs dans la fosse iliaque droite évoquant une crise d'appendicite. La palpation peut permettre de détecter une masse intestinale constituée de tissu intestinal inflammatoire, de mésentère adhérent et induré et de ganglions abdominaux. Dans les formes très inflammatoires, des fistules et des microperforations peuvent survenir, touchant le tissu intestinal voisin, la vessie, la peau, le vagin (plutôt chez les femmes ayant subi une hystérectomie) ou entraînant un abcès mésentérique (**Jean et al., 2013**).

Les lésions jéjunoiléales conduisent à une diminution de la surface intestinale, ce qui induit une malabsorption et une stéatorrhée avec leurs répercussions métaboliques. La diarrhée chronique rapportée par les patients présentant une forme active est liée à une augmentation de la masse de la flore due à la stase, la mauvaise réabsorption des acides biliaires et la diminution de l'absorption de l'eau associée à une sécrétion d'électrolytes. (**Jean et al., 2013**).

Les formes touchant le côlon et la région périanales s'accompagnent de fièvre et de malaises, de diarrhée et de douleurs abdominales. Les saignements sont moins fréquents que dans la RCH mais peuvent être très abondants. Les douleurs sont liées au passage des matières fécales dans une muqueuse inflammatoire à la lumière rétrécie. Des fistules peuvent se développer, impliquant l'estomac, le duodénum ou le vagin. Les lésions périanales apparaissent chez environ 30% des patients. Elles se manifestent par de l'incontinence, des marisques (séquelles cutanées d'hémorroïdes), des fissures anorectales et des abcès. (**Jean et al., 2013**).

La localisation gastroduodénale de la maladie de Crohn se traduit par des nausées, des vomissements nauséabonds et des douleurs gastriques. (**Jean et al., 2013**).

I.5.ELEMENTS DE DIAGNOSTIQUE

I.5.1. La maladie de RCH

I.5.1.1.Endoscopie

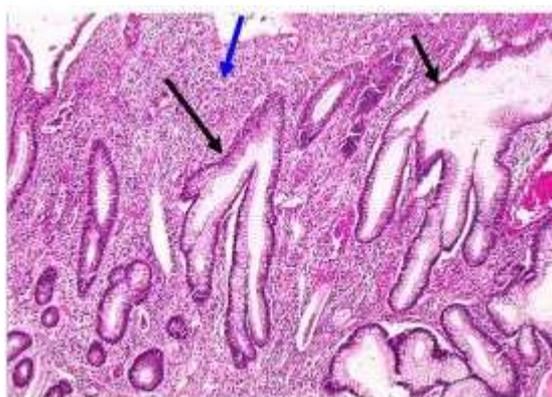
Une étape capitale pour le diagnostic de RCH. Il s'agit de la recto-sigmoïdoscopie ou coloscopie totale, au cours de laquelle sont effectuées des biopsies. Elle a plusieurs objectifs, d'abord diagnostique puis topographique. L'atteinte rectale est constante. Les lésions sont continuées, sans intervalle sain. La coloscopie totale est utile pour préciser la limite proximale des lésions et confirmer l'absence d'atteinte de l'iléon (Ch. Florent, 2006).

I.5.1.2.Les examens radiologiques:

n'ont pas de place dans le diagnostic de la maladie de RCH. Cependant, un cliché de l'abdomen sans préparation est indispensable en cas de colite aiguë grave, car cet examen permet d'affirmer le diagnostic de colectasie(Ch. Florent, 2006).

I.5.1.3.Les lésions histologiques:

sont limitées à la muqueuse. Elles sont diffuses dans les zones touchées, homogènes, sans intervalle de muqueuse saine. Il existe un infiltrat lymphoplasmocytaire du chorion, des abcès cryptiques et une perte de la muco-sécrétion. Il n'y a jamais de granulome épithélioïde. Cependant, aucune de ces lésions n'est spécifique de la RCH. (K. Geboes et al., 1999)



Flèches noires : déformation glandulaire

Flèche bleue : infiltration cellulaire du chorion

Figure 3: lésion histologique d'une RCH (Bouhnik Y,2005).

I.5.1.4. Les signes biologiques:

n'ont pas de valeur diagnostique, ils montrent au cours des poussées un syndrome inflammatoire. Ils apprécient le retentissement homéostatique et nutritionnel de la RCH. Les autoanticorps p-ANCA sont positifs dans 60 à 90 % des cas avec une spécificité de 70 à 90 % (R. Madigliani et *al.*, 2000).

I.5.2. La maladie de Crohn

I.5.2.1. Endoscopie:

Permet de distinguer deux types de lésions : évolutives ou cicatricielles, elles sont fréquemment associées.

L'**iléocoloscopie** est utile pour le diagnostic de la maladie par l'inventaire des lésions initiales, et la réalisation de biopsie est précieuse dans le diagnostic différentiel des colites (recto-colite ulcéro-hémorragique, colites infectieuses). **La coloscopie** permet de dépister des surinfections et des ulcérations profondes qui sont des signes endoscopiques de gravité et de mauvais pronostic. La coloscopie systématique après 8 à 10 ans d'évolution contribue au dépistage des lésions néoplasiques probablement sous-estimées dans les formes coliques de la maladie de Crohn.

L'endoscopie haute, l'échoendoscopie, l'entéroscopie, la vidéocapsule et la cholangiopancréatographie rétrograde per-endoscopique sont d'autres techniques endoscopiques utiles dans des indications précises. (O. Dewit et *al.*, 2003)

I.5.2.2 Les lésions histologiques:

Sont hétérogènes d'un prélèvement à l'autre, l'inflammation est transmurale, parfois focale dans la muqueuse. Il existe des granulomes épithélioïdes (tuberculoïdes) sans nécrose caséuse dans environ 50 à 60 % des cas (Orchard TR et *al.*, 1998).

I.5.2.3. Sur le plan biologique:

Peut être mis en évidence un syndrome biologique inflammatoire associant une protéine C de l'inflammation élevée (CRP), une anémie associant un taux d'hémoglobine abaissé, des signes biologiques de malabsorption témoignant d'une atteinte du tube digestif qui n'absorbe pas les nutriments (albumine, calcium, cholestérol diminués) (E. Israeli et *al.*, 2005).

I.5.2.4. Sur le plan sérologique:

il s'avère que les anticorps anti-*saccharomyces cerevisiae* (ASCA) sont plutôt positifs dans la maladie de Crohn. (E. Israeli et al., 2005)

Tableau 02: Eléments du diagnostic différentiel entre maladie de Crohn et RCH (Ben amer M, 2011).

	MALADIE DE CROHN	RCH
DISTRIBUTION DES LESIONS	iléon, colon, anus	rectum, colon
ATTEINTE RECTALE	Inconstante	Constante
ATTEINTE ANO-PERINEALE	Présence	Absence
STENOSES	Présence	Rare
FISTULES	Présence	Absence
GRANULOME HISTOLOGIQUE	30à 50%	Absence
DISTRIBUTION DES LESIONS	discontinue, toute la paroi	continue, superficielle

I.6.MANIFESTATIONS EXTRA-INTESTINALES

Les manifestations extra-digestives concernent près de 30 % des patients porteurs de MICI, MC et RCH confondues. Elles répondent aux mêmes traitements que ceux utilisés pour traiter la maladie elle-même. On peut ainsi distinguer des manifestations articulaires, cutanéomuqueuses et hépatobiliaires(Williams H *et al.*, 2008).

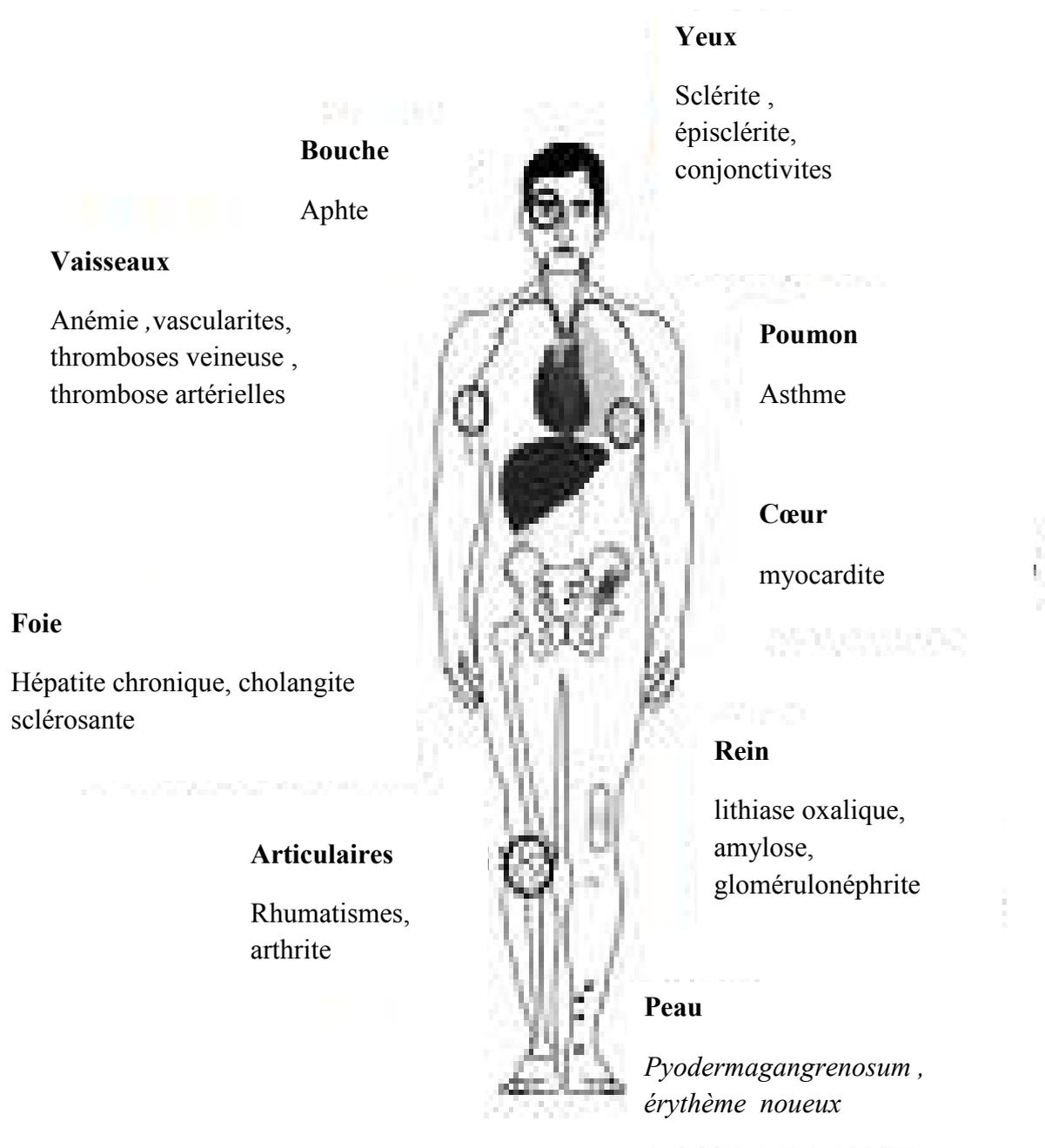


Figure 04: manifestation extra-intestinale (Benamer. M, 2005).

I.7. FORME FAMILIALE DES MICI

I.7.1. Les facteurs génétiques

La place d'un facteur génétique dans les formes familiales repose sur les études des vrais jumeaux (monozygotes). Pour une maladie purement génétique, l'apparition chez des vrais jumeaux de cette maladie est attendue dans 100% des cas. Ce n'est pas le cas pour la RCH où le taux de concordance entre jumeaux monozygotes est seulement de 6 % à 19 % pour la RCH (**Reif S et al., 1997**).

L'étude de référence est une étude suédoise dans laquelle un croisement des registres de jumeaux et de MICI a été réalisé, dans une population géographiquement définie. 44 paires de jumeaux dont un au moins était atteint de MC et 36 paires dont un au moins était atteint de RCH ont été étudiées. Pour la MC, le taux de concordance chez les monozygotes (58,3 %) était significativement supérieur aux taux observés chez les dizygotes (3,9 %) (Chiffre équivalent au risque relatif des parents du premier degré). Les taux de concordance étaient dans les deux cas supérieurs dans la MC par rapport à la RCH où le taux des monozygotes (6,3 %) n'était pas significativement supérieur aux dizygotes (0 %). Une seule paire mixte MC-RCH a été jusqu'à maintenant observée (**Thompson et al., 1996**).

Histoire familiale

8 à 10 % des patients de MC ont des parents atteints de MC . Quant à la RCH, les agrégations familiales apparaissent moins fréquentes et seulement 6 % des sujets atteint de RCH ont des parents atteints de RCH (**HUGOT.J et al.,1995**). Il existe aussi des familles mixtes comportant à la fois une RCH et une MC (**R. MODIGLIANI, 1998**).

Une proportion importante de ces formes familiales est rapportée dans la population juive. Le risque relatif de MICI pour les apparentés des malades est très élevé selon certains modèles mathématiques d'analyse. Il est plus élevé pour les parents du premier degré que pour les parents du deuxième degré (**J. HUGOT et al.,1995**). Il est de 1,3 % pour la MC et de 1 % pour la RCH.

Dans les formes à début précoce de la maladie, le pourcentage de formes familiales est très élevé, en effet, il est de 35 % pour la MC et de 29 % pour la RCH (**J. HUGOT et al.,1995**)et le début de la maladie est de 4 à 10 ans plus précoce pour les cas familiaux que pour les cas

sporadiques (S. NADIR,1999). Ces résultats sont en parfait accord avec toutes les études d'épidémiologie génétique pour beaucoup de maladies familiale. (J. HUGOT et al.,1995).

Récemment, COLOMBEL rapporte que ces formes familiales de MICI pourraient être un sous-groupe homogène, phénotypiquement différent des formes sporadiques. Cette donnée pourrait être importante pour modéliser l'évolution de la maladie et donner des conseils génétiques. Plusieurs études récentes soulignent le rôle de l'hérédité familiale dans le siège des lésions et leur génie évolutif, particulièrement au cours de la MC.

I.7.2. Les facteurs environnementaux

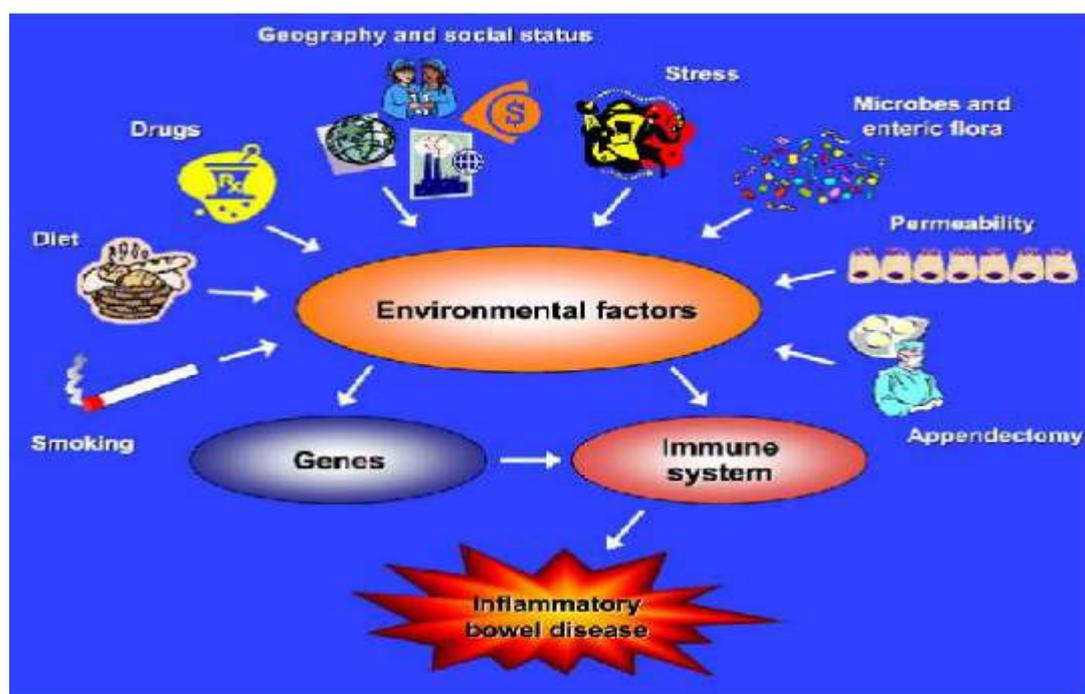


Figure 05: l'impact des facteurs environnementaux sur la pathogénèse des MICI (Söderlund et coll., 2010).

Une variété de facteurs environnementaux modifie l'expression des gènes et module la fonction du système immunitaire intestinal, entraînant réponse inflammatoire persistante inappropriée au niveau intestinal.

Le caractère inflammatoire des MICI a d'abord laissé supposer une origine infectieuse. Plusieurs micro-organismes, en particulier *Mycobacterium paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes* et le virus de la rougeole, ont été incriminés, mais leur causalité n'a pas été clairement démontrée (Eric Leroubours et al., 2003).

Les MICI étant principalement retrouvées dans les pays occidentalisés, le rôle du comportement alimentaire dans l'apparition de la maladie a été évoqué.

La théorie « hygiéniste », souvent évoquée dans les maladies auto-immunes, est l'une des hypothèses émises dans l'étiologie des MICI. Cette théorie suggère qu'un niveau d'hygiène élevé durant l'enfance limite l'exposition aux antigènes environnementaux et empêche l'induction d'une tolérance du système immunitaire à l'égard des micro-organismes non pathogènes. La répartition géographique et l'évolution des taux d'incidence peuvent être corrélées au niveau d'hygiène des populations résidentes (**Eric Leroubours et al., 2003**).

Des facteurs psychologiques tels qu'un terrain anxieux, un stress important ou une dépression peuvent favoriser l'exacerbation des symptômes lors des épisodes de poussée. Ces facteurs psychologiques ne peuvent pas être responsables de l'isolement, de l'apparition d'une MICI. Cependant, ils modifient certainement l'évolution et la sévérité de la pathologie(**S.Shivananda et al, 1996**).

I.7.3.Gènes de prédisposition:

La cause des MC est d'origine génétique ou environnementale reste ouverte, Il est probable que la cause est une combinaison des deux: la prédisposition(Sensibilité) est héréditaire et quand il est exposé à un agent de l'environnement, il favorise le développement de cette maladie (**Watts et al. 2002**).

I.7.4.Le gène NOD2 / CARD15:

Le premier gène identifié et le plus étudié à l'heure actuelle est le gène NOD2 (Nucleotide-bindingOligomerization Domain 2) aussi appelé CARD15 (Caspaserecruitmentdomain 15). Il a été découvert conjointement par deux équipes en 2001 par étude de liaison génétique sur des familles atteintes de MC. C'est le gène de susceptibilité le plus fortement associé à la MC(**Hugot et al., 2007**).

De plus, ces études ont été réalisées sur les phénotypes HLA et non sur les génotypes qu'il est maintenant possible d'étudier par les techniques de biologie moléculaire.

En 1992, l'équipe de J.Rotter à Los Angeles a décrit des associationsentre le génotype HLA-DR2 et la rectocolite hémorragique, et entre les génotypes HLA-DR1, DQW5 et l'association DR1 -DQW5 et la maladie de Crohn(**Rotter JI et al., 1994**).

I.7.4.1 Localisation chromosomique et structure:

Le gène NOD2 est situé en 16q12, dans la région péri-centromérique du chromosome 16 (locus IBD-1) (Figure 4). NOD2 code une protéine intra-cytoplasmique de 1040 acides aminés. La protéine NOD2 fait partie de la super-famille des PRR (Pathogen Recognition Receptor). On distingue trois grandes familles de PRR : les TLR (TollLikeReceptors) situés dans la membrane cellulaire, les RLR (Retinoicacid inducible gene1 LikeReceptors) impliqués dans la reconnaissance des virus, et les NLR (NOD-like

Receptors). Les NLR sont intra-cytoplasmiques et sont caractérisés par la présence d'un domaine LRR et d'un domaine NOD. Seul le domaine effecteur varie. NOD2 appartient à la famille des NLR.

NOD2 possède la structure caractéristique des protéines NLR : un domaine N-terminal CARD (CaspaseRecruitment Domain), un domaine central NACHT ou NOD (Nucleotide-binding and Oligomerization Domain) et un domaine C-terminal riche en leucine LRR (Leucine RichRepeat) (Figure 5) (Lamoril et al., 2007).

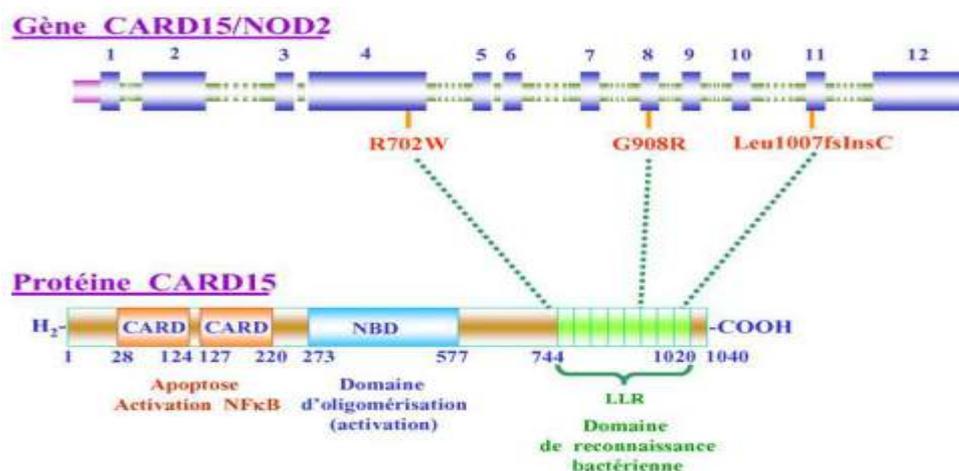


Figure 6: Structure du gène *CARD15* qui contient deux domaines de recrutement et d'activation des caspases situés en N-terminal (CARD, *caspase-recruitment domain*), liés à un domaine de liaison aux nucléotides (NBD, *nucleotide-binding domain*) et un domaine C-terminal composé de motifs répétés riches en leucines (LRRs, *leucin-rich repeats*). Les flèches indiquent la localisation des 3 principales mutations décrites au cours de la maladie de Crohn. (Lamoril et al., 2007)

Le domaine LRR est impliqué dans la reconnaissance du ligand bactérien, le muramyl dipeptide (MDP), dérivé des peptidoglycanes (PGN) de la paroi bactérienne (**Girardin et al., 2003 ; Inohara, N et al., 2003**). C'est la liaison du domaine LRR avec son ligand qui libère le site actif NOD/NACHT de la protéine. Le domaine NOD, qui constitue le domaine catalytique de la protéine, est capable de lier un nucléotide de type ATP. L'activation de la protéine NOD2 par le MDP entraîne donc une dimérisation de NOD2 par le domaine NOD. Le domaine CARD est le domaine effecteur ; il permet la transmission du signal, notamment par son interaction avec la protéine Rick/Rip2 intervenant dans la cascade pro-inflammatoire NF- κ B (**Inohara, N et al., 2003**). NOD2 fait donc partie d'un système de signalisation complexe dont la connaissance est encore incertaine.

I.7.4.2. Ligand de la protéine NOD2 :

NOD2 appartient à une famille de protéines impliquées dans la réponse immunitaire innée de l'hôte vis-à-vis des agents bactériens. L'immunité innée permet la reconnaissance de structures microbiennes relativement invariantes et une réponse immédiate de l'organisme, à l'opposé de la réponse immunitaire adaptative. Le gène NOD2 code un récepteur intra-cytoplasmique de la famille des NLR impliqués dans la reconnaissance des PAMP. Les PAMP sont des composants spécifiques du monde microbien, pas ou peu polymorphes, parmi lesquels on trouve le peptidoglycane (PGN) et le lipopolysaccharide (LPS). On distingue trois grandes familles de PRR : les TLR (TollLikeReceptors) situés dans la membrane cellulaire, les RLR (Retinoicacid inducible gene1 LikeReceptors) impliqués dans la reconnaissance des virus, et les NLR. Les NLR sont intra-cytoplasmiques et sont caractérisés par la présence d'un domaine LRR et d'un domaine NOD ou NACHT. Seul le domaine effecteur varie (**Girardin, S.E., et al., 2003**).

NOD2 fait partie de la famille des NLR et reconnaît des molécules dérivées du PGN via son domaine LRR [36]. Le PGN est présent chez la très grande majorité des bactéries où il intervient dans la rigidité de la paroi bactérienne. Il forme une enveloppe fine chez les bactéries à Gram négatif et une enveloppe épaisse chez les bactéries à Gram positif. Le PGN est formé de chaînes de composés glucidiques alternant un acide N-acétyl-muramique (MurNAc) et un N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) reliées par des peptides.

NOD2 reconnaît des produits de dégradation du PGN, dont le plus petit motif est le MDP, composé d'un acide N-acétyl-muramique et de deux peptides (**Girardin, S.E., et al., 2003**)

I.7.4.3.Fonctions de la protéine NOD2 :

NOD2 est exprimé dans les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules de Paneth et les cellules épithéliales de l'intestin (**Ogura, Y., et al., 2003**). NOD2 fait partie d'un réseau protéique complexe. Suite à l'activation de la protéine NOD2 par le MDP, le domaine CARD va former un complexe avec des protéines intra-cytoplasmiques. L'interaction la plus étudiée est celle de NOD2 avec Rick/Rip2. Rip2 est une serine-thréonine kinase qui interagit directement avec le domaine CARD de NOD2. Cette interaction est indispensable à l'action pro-inflammatoire de NOD2 via le NF- κ B. Le recrutement de Rip2 initie une cascade d'événements qui impliquent TAK1 (TGF- β Activated Kinase 1), IKKg (Inhibitor of nuclear factor κ B Kinase γ), I κ B et c-rel, activant les voies de signalisation NF- κ B, MAPK et JUNK (JUN N-terminal Kinase) (**Xavier, R.J. et al., 2007**). Ces voies jouent un rôle central dans la sécrétion de molécules pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, TNF, CCL2, IL-5...) et anti-inflammatoires (IL-10). En situation normale, la stimulation de NOD2 par le MDP oriente plutôt la réponse immunitaire vers un profil Th2, caractérisé par l'expression de l'IL-5 et l'IL-4, tandis que la stimulation des TLR par le LPS entraîne l'expression de cytokines caractéristiques d'un profil Th1 (TNF, IL-6...) (**Magalhaes, J.G., et al., 2008**). Néanmoins, en situation d'infection aiguë par un pathogène intestinal, la stimulation de NOD2 oriente la réponse immunitaire vers un profil Th17. L'axe NOD2/Th17 serait donc un élément central du contrôle des pathogènes intestinaux (**Geddes, K., et al., 2011**). NOD2 est aussi exprimé au niveau des cellules de Paneth, où il participe à la synthèse des peptides antimicrobiens (**Ogura, Y., et al., 2003**). Enfin, une étude montre que la protéine NOD2 possède une activité antibactérienne propre, via son interaction directe avec le MDP bactérien. Le domaine LRR de NOD2 interagit directement avec la bactérie *in vitro*, altère son métabolisme et détruit l'intégrité de sa membrane plasmique. Une activité antibiotique serait aussi exprimée par le domaine LRR d'autres protéines de la famille des NLR, ce qui suggère que le domaine LRR est un motif conservé de l'immunité innée. Cette activité antibiotique disparaît quand le gène NOD2 porte les mutations associées à la MC [**Perez, L.H., et al., 2010**]. NOD2 est donc impliquée dans la reconnaissance et l'élimination des bactéries intracellulaires (**Sirard, J.C., et al., 2007**).

NOD2 intervient aussi dans d'autres mécanismes de défense contre les bactéries invasives. Des études montrent que l'activation de NOD2 est indispensable au

mécanisme de l'autophagie dans les cellules dendritiques et les macrophages. NOD2 participe notamment à la formation du phagosome suite à l'entrée d'une bactérie invasive dans la cellule **(Cooney, R., et al., 2010)**.

NOD2 participe également à l'activation de l'inflammasome. L'inflammasome est un complexe multi-protéique qui active la caspase-1, responsable de la maturation et de la sécrétion de l'IL-1 β ou de l'IL-18. Ce complexe est activé en cas d'agression bactérienne en particulier par des bactéries invasives. NOD2 interagirait directement avec la caspase-1 en association avec Nalp1 **(Hsu, L.C., et al., 2008)**, mais le mécanisme exact reste à déterminer.

NOD2 serait aussi impliqué dans la modulation des récepteurs bactériens TLR2, TLR3 et TLR4 **(Tsai, W.H., et al., 2011)**. Une étude sur modèle animal a montré que NOD2 aurait un effet inhibiteur sur la voie des TLR en limitant la réponse inflammatoire enclenchée par la liaison du TLR2 à son ligand bactérien **(Watanabe, T., et al., 2004)**. La stimulation de NOD2 régulerait aussi l'expression du récepteur à l'IL-1 β , diminuant la réponse inflammatoire. Inversement, la stimulation chronique par l'IL-1 β diminuerait la tolérance induite par NOD2 **(Hedl, M. and C. Abraham, 2010)**. La stimulation de NOD2 serait donc responsable de l'activation de l'inflammation en cas d'infection aiguë, mais induirait un phénomène de tolérance après une exposition prolongée à un organisme **(Petnicki-Ocwieja, T., et al., 2011)**. La perte de cette tolérance due aux mutations du gène NOD2 pourrait expliquer l'hyperréactivité du système immunitaire inné vis-à-vis de la flore commensale dans la MC.

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

Enfin, NOD2 semble aussi impliqué dans la croissance des cellules épithéliales. En effet, des cellules épithéliales invalidées pour le gène NOD2 ont montré une diminution de prolifération et une augmentation de l'apoptose **(Cruickshank, S.M., et al., 2008)**. Ce

défaut de croissance des cellules épithéliales pourrait contribuer aux lésions observées dans la MC.

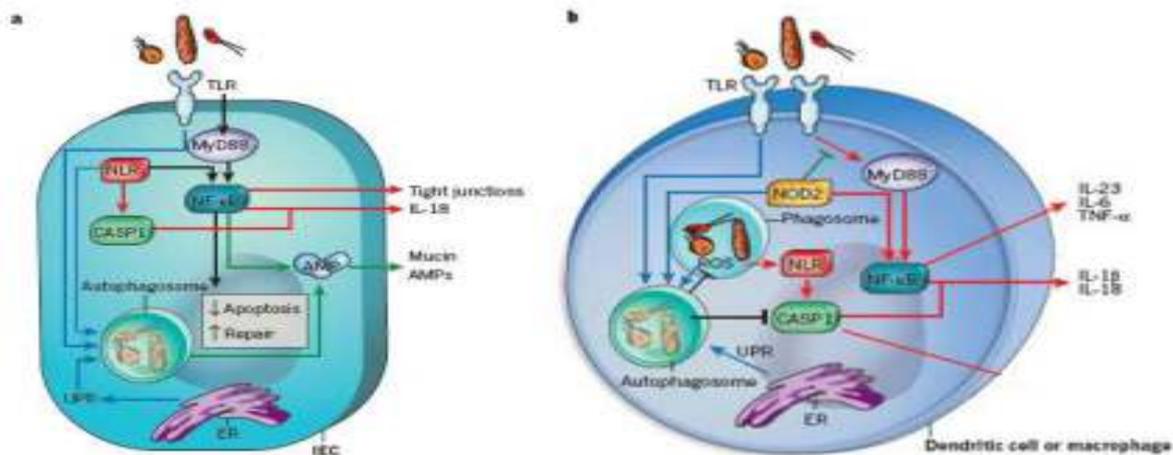


Figure 7: Maintien de l'homéostasie intestinale et mécanismes de reconnaissance bactérienne par les cellules épithéliales intestinales (a) et les cellules dendritiques ou les macrophages (b). (Maloy, K.J. and F. Powrie, 2011).

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

b. Dans les cellules dendritiques et les macrophages, l'inflammation est induite par l'activation du NF-κB, provoquant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-23, IL-6, TNF), et par l'activation de la caspase-1 (CASP1) induisant la sécrétion d'IL-1β et d'IL-18 (flèches rouges). Cette inflammation peut être régulée par la suppression du signal du TLR par NOD2 (ligne verte) et par la stimulation de l'autophagie par NOD2 (flèches bleues) atténuant l'activation de la caspase-1 (ligne noire). Un défaut de NOD2 peut donc contribuer à l'inflammation excessive observée dans la MC. (Maloy, K.J. and F. Powrie, 2011).

I.7.4.4. Polymorphismes de NOD2

Trois variant génétiques de NOD2 ont été rapportés associés à la MC. Ces trois mutations indépendantes représentent 80% des mutations de ce gène : deux mutations faux-sens non conservatrices (R702W et G908R) et une mutation décalante (L1007fsinsC) générant une protéine tronquée de 32 acides aminés (**Lesage, S., et al 2002**). Trente à quarante pourcents des malades atteints de MC portent au moins une de ces mutations, contre 14% dans la population contrôle. Ce chiffre monte à 50% chez les caucasiens.

L'association entre la présence de mutations NOD2 et la MC a été établie par de nombreuses études dans des populations différentes. En l'absence de variant génétique fréquent identifié chez les asiatiques et les africains, la mutation du gène NOD2 n'est pas associée à la MC dans ces populations. Chez les caucasiens, les variations génétiques de NOD2 ne sont pas réparties de manière homogène. Ainsi, les mutations sont rares en Scandinavie mais fréquentes en Italie ou en Grèce (**Hugot, J.P., et al., 2007**). Au niveau individuel, le risque relatif de déclencher une MC lorsqu'on est porteur d'une des trois mutations principales dépend du nombre et de la nature des mutations. Les odds ratios (OR) de MC sont respectivement de 2, 3 et 4,6 pour les variants R702W, G908R et 1007fsinsC à l'état hétérozygote, alors qu'ils sont respectivement de 3,3, 12 et 35 pour les mêmes variants à l'état homozygote (**Pascoe, L., et al., 2007**).

Le gène NOD2 est à ce jour le facteur génétique le plus important de la MC, mais ce facteur reste modeste, même pour la mutation 1007fsinsC la plus à risque. Les études de corrélation génotype/phénotype ont clairement établi que les patients mutés pour le gène NOD2 avaient un âge de début de maladie plus jeune de quelques années, qu'ils avaient plus souvent une atteinte iléale, et que la maladie était plus souvent de type sténosant ou fistulisant (**Cuthbert, A.P., et al., 2002**). Les enfants atteints de MC et porteurs d'une mutation NOD2 sont susceptibles de recourir plus tôt à la chirurgie que les autres (**Lacher, M., et al., 2010**). Une étude récente a montré que la présence de mutation NOD2 influe sur la prise en charge thérapeutique. En effet, un plus grand pourcentage de patients porteurs de mutations NOD2 étaient réfractaires aux corticoïdes, mais répondaient bien à un traitement par immunosuppresseurs. A l'inverse, les patients porteurs du gène sauvage, étaient répondeurs aux corticoïdes et présentaient une meilleure réponse aux anti-TNF (**Niess, J.H., et al., 2011**). Malgré tout, à l'heure actuelle le génotypage systématique n'est pas recommandé.

I.7.4.5.Effets des mutations NOD2:

Plus de 90% des mutations du gène NOD2 associées à la MC portent sur le domaine LRR. La perte de fonction de ce domaine entraîne une perte de réponse de la protéine NOD2 pour le MDP, renforçant l'idée d'un défaut de clairance bactérienne dans le déclenchement de la maladie, en cas de mutation de NOD2 (Kobayashi *et al.*,2005). Une perturbation de l'immunité innée, via l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF ou l'Il-1 β est aussi imputée à la mutation du gène NOD2 (Yamamoto-Furusho *et al.*,2007 ; Maeda *et al.*,2005), ainsi qu'un défaut de l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Philpott *et al.*, 2009).

I.7.5.Facteurs immunologiques

I.7.5.1.Immunopathogénèse de la Maladie de Crohn

Les bactéries commensales traversent la muqueuse intestinale via les cellules M ,ces bactéries sont captées par les cellules dendritiques au niveau des plaques de Peyer ,ces cellules migrent jusqu'au ganglion lymphatique mésentérique, via un canal lymphatique, l'antigène est ensuite présenté aux lymphocytes B et T, les lymphocytes B vont se transformer en plasmocytes et produire des anticorps neutralisants ,qui regagnent la circulation sanguine. certaines bactéries sont phagocytées par les macrophages (Figure 6) (Macpherson et Harris *et al.*,2004) .

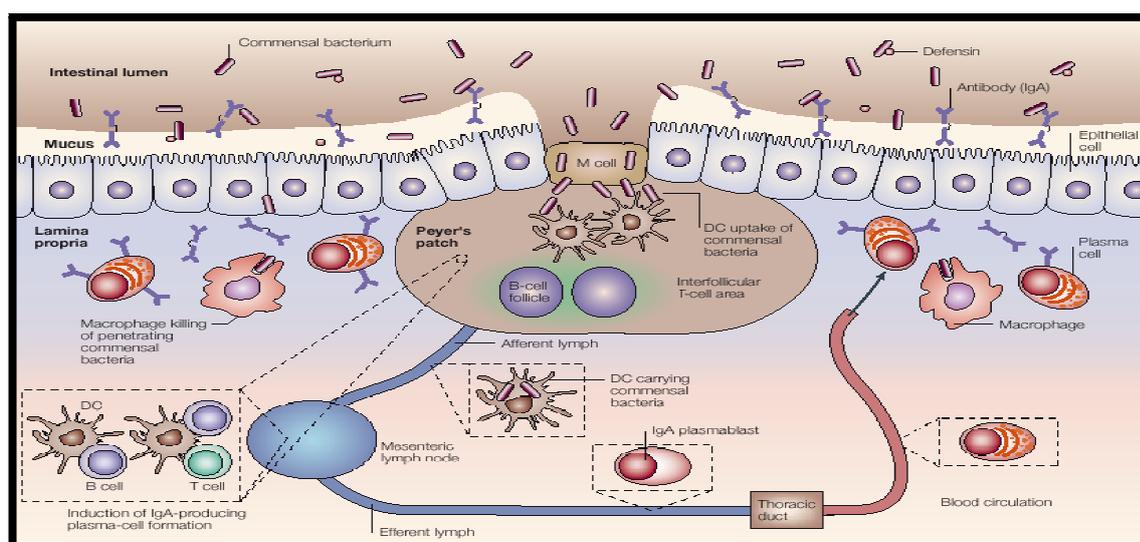


Figure 8 : Immunopathogénèse de la MC (Macpherson et Harris *et al.*,2004)

Les MICI s'associent à des maladies liées aux gènes du complexe majeur d'histocompatibilité.

I.8. LE COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE(CMH)

I.8.1. Propriétés génétiques

Le complexe majeur d'histocompatibilité est un ensemble de gènes situés sur le bras court du chromosome 6 codant pour des antigènes de surface appelé chez l'homme HLA (HumanLeuocyte Antigène) jouant un rôle déterminant dans le rejet d'une greffe. Tous les mammifères possèdent un CMH d'organisation différente, mais ayant la même fonction(Figure 6). Le système HLA est le complexe génétique le plus polymorphe chez l'homme. Cette diversité, déjà importante chez chaque individu, est considérable au niveau de la population humaine (**Dausset et al, 1995**).

La région HLA est subdivisée en trois classes :

- **HLA classe I (HLA CI I):** cette classe occupe la région télomérique. Elle renferme trois gènes fonctionnels d'histocompatibilité classiques : HLA-A, B, C et d'autres gènes non classiques : HLA-E, F, G, H et I.
- **HLA classe II (HLA CI II):** elle est la plus centromérique et les trois principaux produits de classe II sont DR, DQ, DP.
- **HLA classe III (HLA CI III):** la région du CMH classe III est intermédiaire entre HLA CI I et HLA CI II. Elle renferme un ensemble de gènes codants, entre autres, pour les composants du complément : C4B, C4A, Bf, C2, qui sont polymorphes, ainsi que le gène codant pour la 21 hydroxylase (entre B et DR) et dont le déficit entraîne l'hyperplasie congénitale des surrénales.

Seuls les gènes de classe I et de classe II codent pour les antigènes d'histocompatibilité (**Dausset et al, 1995**).

I.8.2. Nomenclature

D'après les règles internationales de nomenclature, établies en septembre 1977 lors du VII^{ème} Workshop à Oxford, les spécificités sont désignées sous le terme HLA, suivies d'une lettre désignant le locus (A, B, C, DQ, DR, DP), elle-même suivie d'un numéro identifiant l'allèle. (**Bodmer et al, 1998**).

Si l'antigène n'est pas encore parfaitement identifié, le numéro est précédé de la lettre W (Workshop), La série HLA-CW garde le suffixe W pour la différencier du complément.

On appelle phénotype HLA d'un individu, l'ensemble des antigènes décelés chez cet individu. On l'exprime alors série par série : HLA-A1, A2 ; B5, B7 ; CW3, CW5. Lorsqu'un phénotype est incomplet, on désigne le ou les antigènes indéterminés par un blanc ou par un X, (**Bodmer et al, 1998**).

I.8.3. Les caractéristiques du système HLA

Les gènes HLA, principalement ceux de classe I et de classe II se caractérisent par trois propriétés majeures : le polymorphisme, la transmission autosomale-codominante et le déséquilibre de liaison.

I.8.3.1. Polymorphisme extrême

Le polymorphisme des antigènes HLA résulte d'une variabilité en acides aminés ou en nucléotides due à des mutations anciennes ou à des phénomènes de conversion géniques. Ce poly-allélisme est responsable du polymorphisme, d'où la difficulté de trouver des individus compatibles en dehors des jumeaux homozygotes (**Degos, 1994 ; Charon, 1997**).

I.8.3.2. Transmission autosomalecodominante

Pour chaque locus HLA donné, 2 allèles sont définis : Allèle paternel et Allèle maternel, cela signifie que chaque allèle sur chaque chromosome est exprimé. La plupart des individus sont donc hétérozygotes pour chaque locus, hormis lorsque les deux parents expriment par hasard les mêmes allèles. (**Degos, 1994**).

I.8.3.3 Liaison étroite:

Tous les gènes sont transmis en bloc (haplotype) des parents aux enfants. Pour chaque parent, il existe deux séries de gènes qui peuvent être transmis en bloc (haplotypes). Au total, quatre haplotypes sont présents : deux chez le père (a et b) et deux chez la mère (c et d). Chaque enfant reçoit un haplotype venant du père et un venant de la mère. Il existe donc quatre types d'enfants : a/c, a/d, b/c, et b/d. Ainsi, la probabilité pour deux enfants d'être HLA identiques est de 25 % ; d'être HLA différents, de 25 % ; et d'être HLA semi-identiques, de 50 %.

Une recombinaison entre deux haplotypes peut survenir et donner un nouvel haplotype. Le taux de recombinaison entre HLA-A et B et HLA-B et D est de 0,8 %. HLA-C étant très proche de HLA-B, il n'existe pratiquement pas de recombinaison HLA-B, C (Degos, 1994)

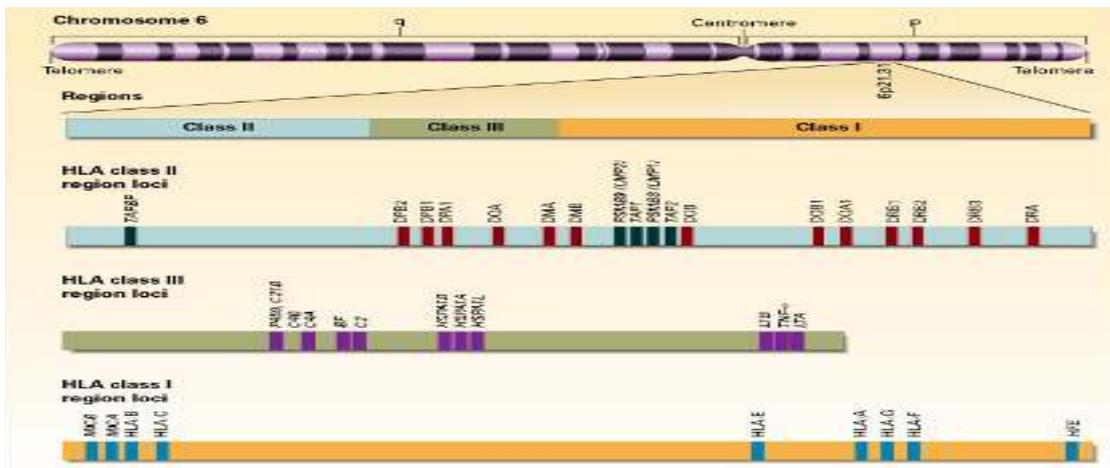


Figure 9 : Structure du système HLA (Klein et Sato, 2000)

II.1. MATERIELS

Dans notre travail, nous avons colligé au service de médecine interne CHU Mustapha Bacha 5 familles soit 5,80% des dossiers étudiés, présentant une MICI.

Le recrutement a débuté en juin 2013. Nous avons commencé l'exploitation des résultats et le recueil final des données de la bibliographie à partir de fin août 2013.

II.1.1 mode de recrutement

Le recrutement des patients a été fait par téléphone.

Une entrevue bi hebdomadaire a été ouverte au service de médecine interne CHU Mustapha qui nous a permis de récupérer et de consigner les données recueillies sur une fiche d'exploitation dont les principaux points

- L'âge
- Le sexe
- Antécédent familiale
- Manifestation extra-intestinale

Les éléments recueillis ont été notés, et ayant servi de support dans notre étude.

II.2.ECHANTILLONS

Prélèvements 5ml de sang total dans des tubes EDTA.

II.3. METHODES

II.3.1.Etude statistique

L'analyse statistique des données s'est déroulée selon les modalités suivantes :

Confection de tabulation et graphes.

Nous avons préparé les tables descriptives à une, deux ou trois variables.

Les résultats ont été présentés sous forme de graphes (histogramme et diagramme en barre).

La valeur de probabilité significative est de 0,05 (5%)

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Epi-info version 7.1.2.0 (Epi-Info).

II.3.2. Etude moléculaire

II.3.2.1. Extraction de l'ADN génomique

- **Principe**

Le kit Quiagène permet l'extraction de l'ADN génomique à partir d'un échantillon de 200 µl de sang total sur EDTA.



Prélèvement
buffy-coat

centrifugation
dans un eppendorf

le Buffy-coat

aspiration de

buffy-coat



Agitation aux vortex

addition d'éthanol

l'eppendorf dans un thermoblok

après agitation

agitation aux vortex



Transfert de contenu
dans une colonne Quiagene

centrifugation

remplacement de la
poubelle par une autre

addition de AW1

centrifugation



Centrifugation

addition de solution

centrifugation

addition de AW2



L'ADN après extraction
réparti en deux eppendorf et
prêt pour le typage

II.3.2.2. PCR

II.3.2.2.1. Amplification de l'ADN génomique par PCR:

C'est une méthode d'amplification in vitro d'une séquence spécifique d'ADN. Cette méthode consiste à utiliser une paire d'amorce d'oligonucléotides de synthèse situés de part et d'autre de la séquence à amplifier.

Cette réaction nécessite :

- **des désoxyribonucléotides triphosphates**(dNTPs: ATP, GTP, CTP, TTP).
- **MgCl₂** (Chlorure de magnésium): L'ion Mg²⁺⁺ est un cofacteur essentiel de la Taq polymérase, il sert à stabiliser l'hybridation, plus sa concentration est importante plus l'hybridation est facilitée.
- Tampon**: qui sert à tamponner le milieu réactionnel afin de garder un niveau optimal pour la Taq polymérase.
- **Les amorces**: ce sont des séquences oligonucléotidiques situées de part et d'autre de la séquence à amplifier.
- **Taq polymérase**.
- Adjuvant de type DMSO**: il est utilisé pour optimiser la réaction du PCR surtout lorsqu'il s'agit d'une séquence riche en bases GC difficile à dénaturer. Ce réactif améliore la dénaturation de deux brins en facilitant la rupture des liaisons hydrogènes reliant les deux brins de la molécule de l'ADN.

- **H₂O**

- **Ultra-puce**

La réaction du PCR se déroule en trois étapes:

- La dénaturation des séquences double brin à 94 °C
- L'hybridation spécifique des amorces à une température permettant leurs Hybridations.
- L'extension des amorces.

Ces trois étapes sont répétées plusieurs fois au bout de **n** cycles pour avoir finalement une quantité d'ADN de **2ⁿ**.

Protocole expérimental :

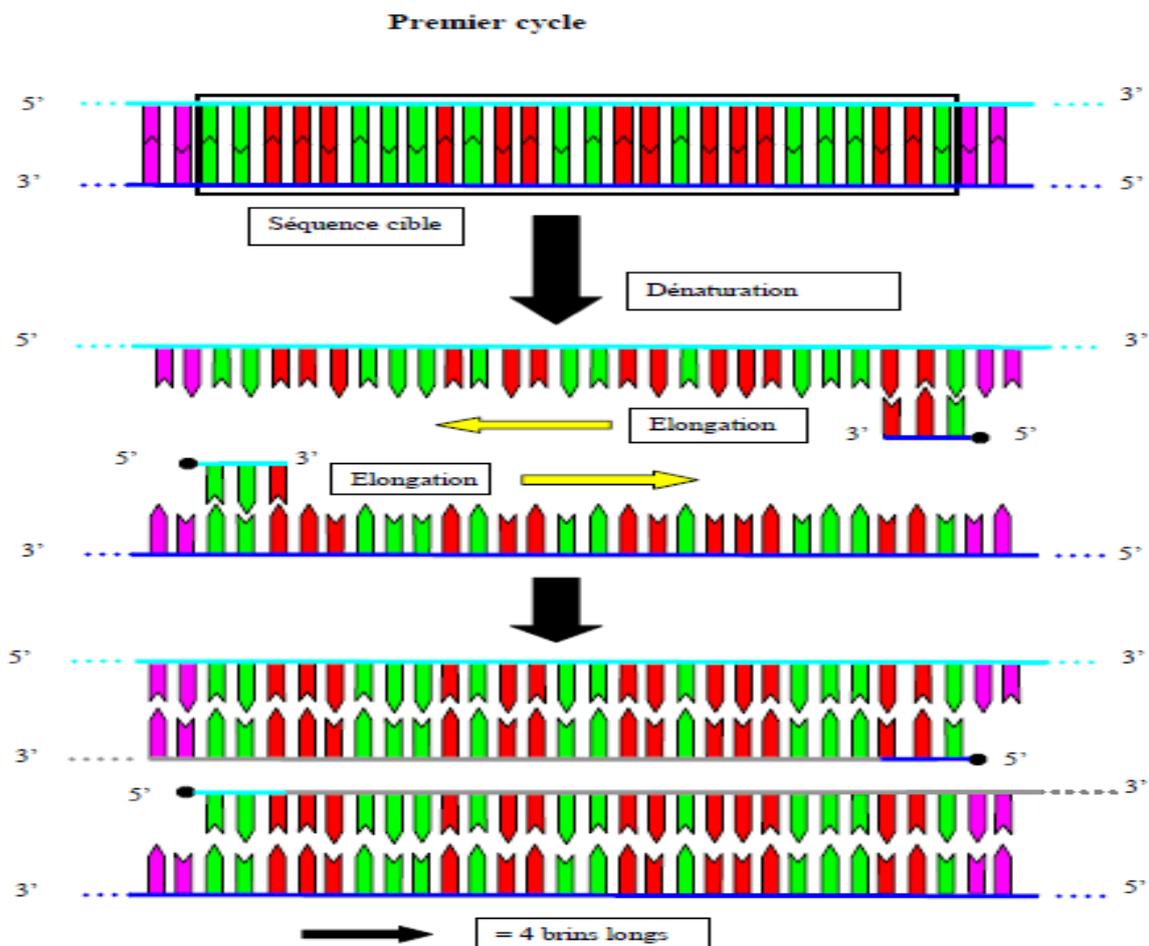
La réaction du PCR se déroule dans un thermocycleur avec un volume final de 50µl contenant:

- H₂O
- dNTPs
- MgCl₂
- Tampon
- Amorce: oligo F, Oligo R
- Taqpolymerase
- ADN

Cette réaction se déroule selon le programme suivant:

Dénaturation initiale 5 mn à 95 °C

}	Dénaturation 95°C	30 secondes	30 cycles
	Hybridation T _m °C	30 secondes	
	Elongation 72 °C	30 secondes	
Elongation finale 5mn à 72°C			



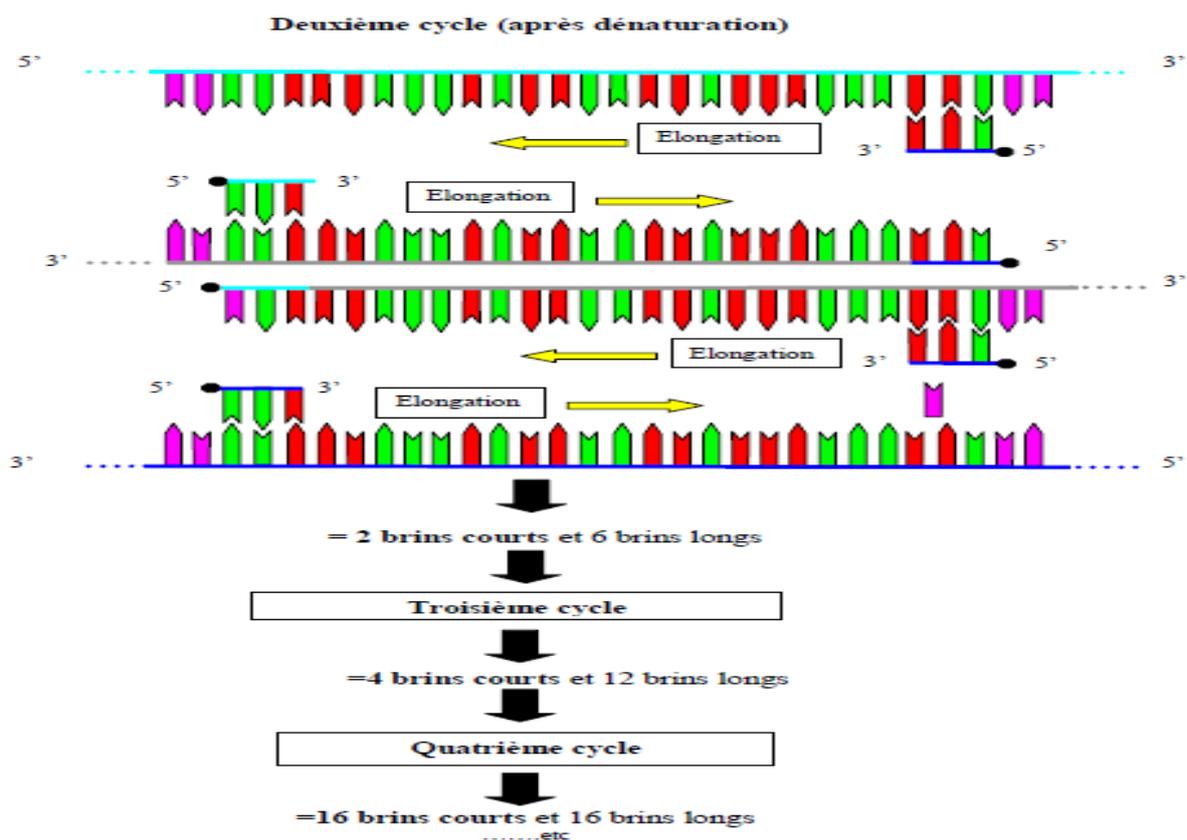


Figure 9: les différentes étapes de la PCR

II.3.2.3. Dosage de l'ADN par Spectrophotométrie

L'évaluation de la concentration et de la pureté de l'ADN est réalisée par Spectrophotométrie ; en effet, les bases puriques et pyrimidiques absorbent fortement dans l'UV à 260 nm. Une unité de DO à 260 nm correspond à une concentration d'ADN double brins de 50µg/ml. L'éventuelle contamination protéique peut être appréciée par une seconde lecture de DO à 280 nm dans la mesure où les protéines absorbent à ces deux DO : Un ADN pur doit présenter un rapport DO 260/280 compris entre 1,8 et 2,0.

nomenclature

Sur le plan de la nomenclature, un allèle au niveau génomique est défini comme suit :

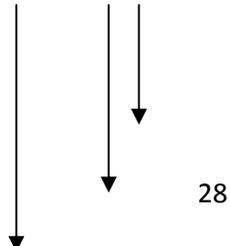
Gène étudié suivi d'un puis de 4 à 5 chiffres indiquant la spécificité HLA

ou

Motif générique suivi du motif allélique

Exemple:

HLA-DRB1* 03:01



Motif allélique (biologie moléculaire)

Motif générique (Sérologie ou biologie moléculaire)

Gène étudié

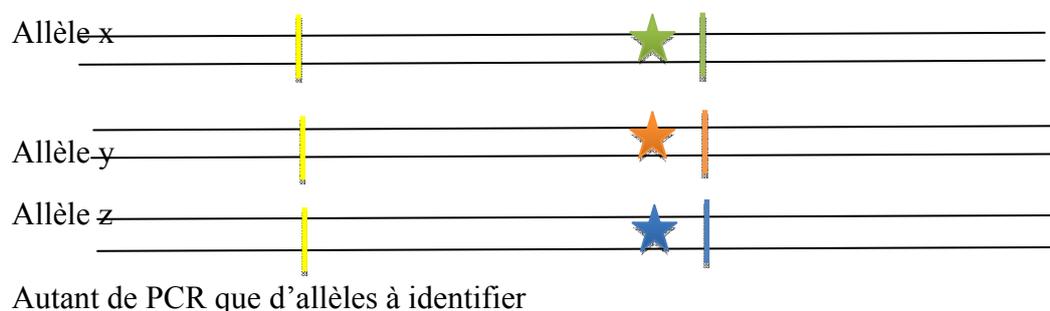
Le typage des allèles HLA classe II (DR et DQ) est réalisé par la technique de PCR-SSP High résolution en utilisant des barrettes contenant :

- une paire de primer spécifique des allèles HLA classe II

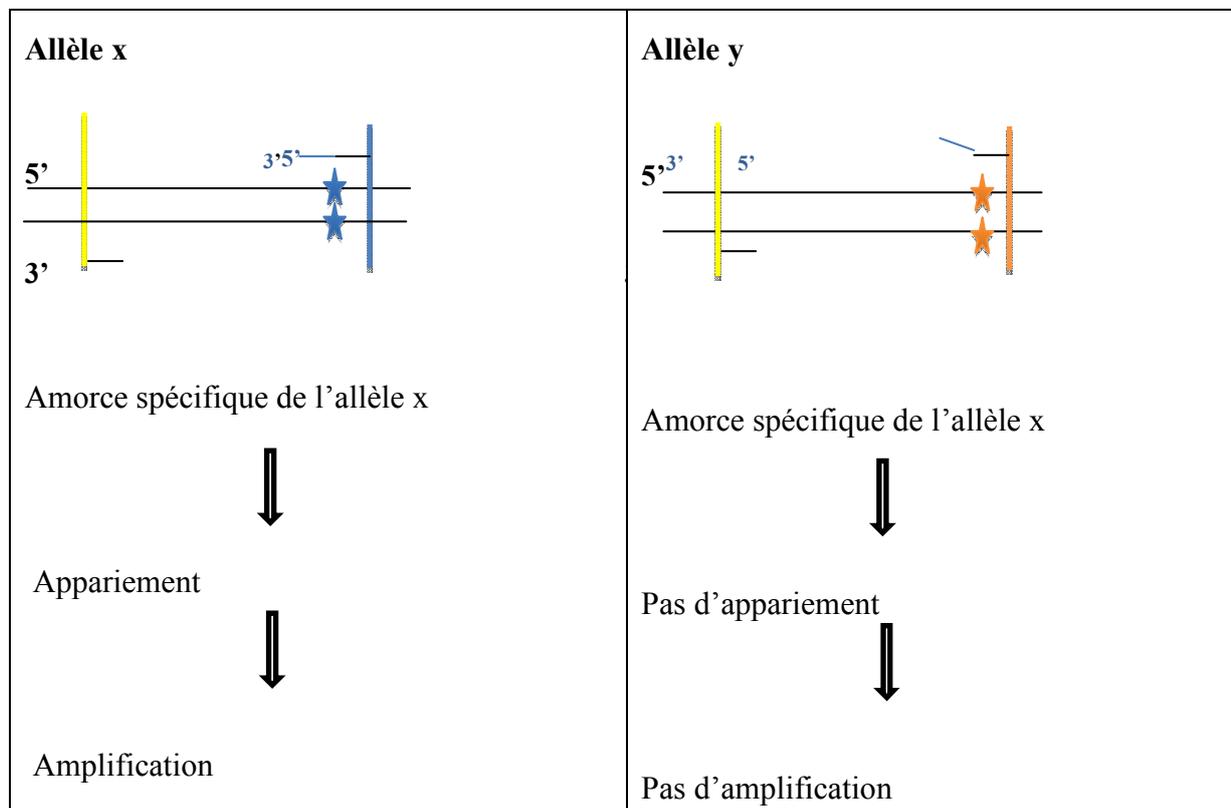
II.3.2.4. Typage HLA classe II par technique de PCR-SSP

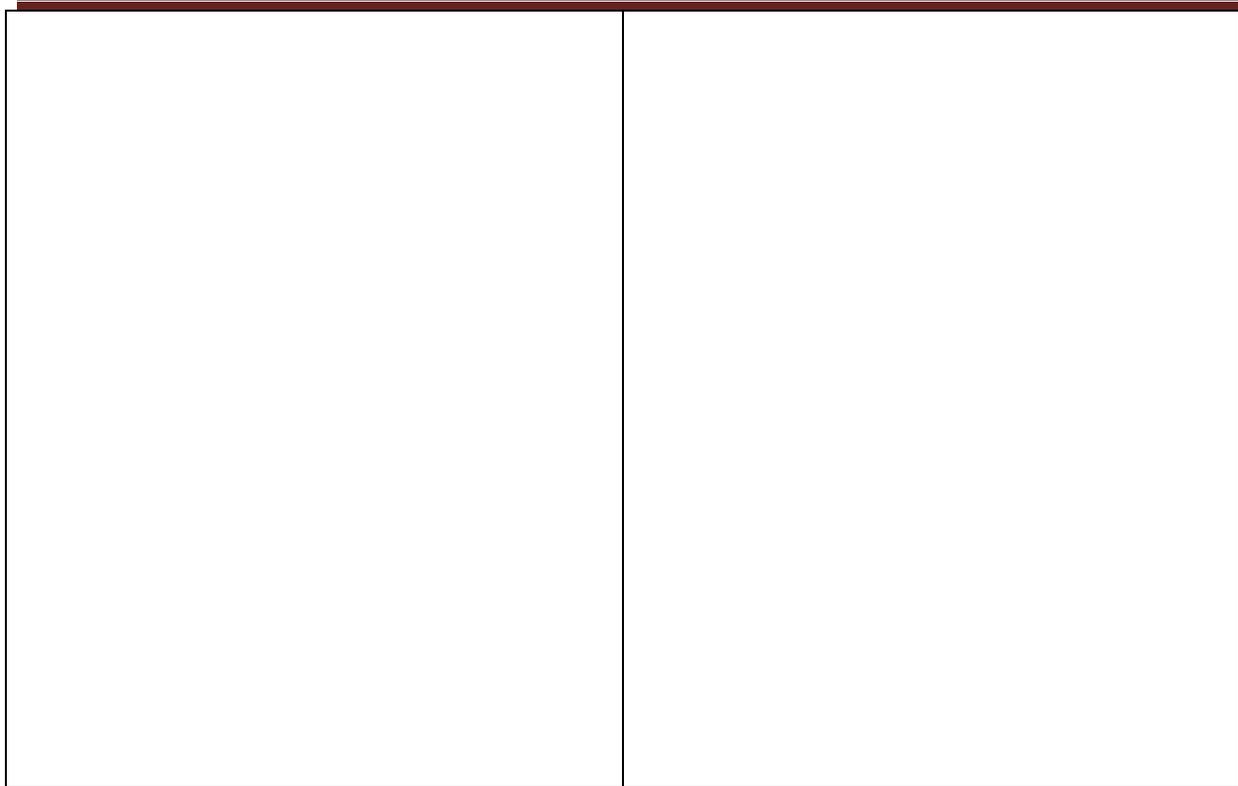
Etant donné que le complexe HLA présente des gènes ayant un grand nombre de variant alléliques, l'amplification par la technique PCR-SSP (Séquence Spécifique Primer) est basée sur la sélection de couples de primers choisis dans les régions polymorphes.

A)



B)





C) Révélation par électrophorèse

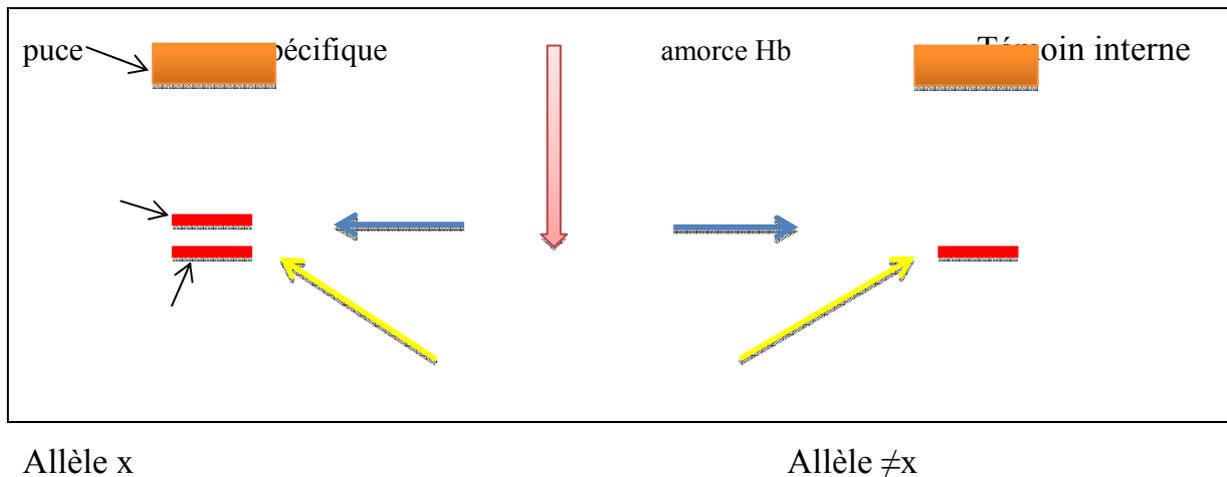


Figure 10: A, B, C : principes de la PCR-SSP

II.3.2.4.1. Mode opératoire:

Préparation de la plaque de Micro-SSP :

Sortir les plaques de typage et D-Mix (tampon contenant du $MgCl_2$ et les 4 dNTP) et les laisser prendre la température ambiante. La Taq polymérase n'est retirée du froid qu'au moment de l'utilisation.

-Prendre 5,6µl de Taq polymérase et le verser dans le D-Mix.

Prendre 9µl de ce mélange (Taq /D-Mix) avec 1µl de tampon PCR et le mettre dans le puits H1 c'est le contrôle négatif.

-Ajouter 11µl de l'ADN dans le mélange D-Mix/Taq et agiter au vortex.

-Répartir le mélange ADN/D-Mix/Taq à raison de 10µl dans tous les puits des plaques sauf dans les puits de contrôle négatif.

- tampon PCR (tampon négatif)

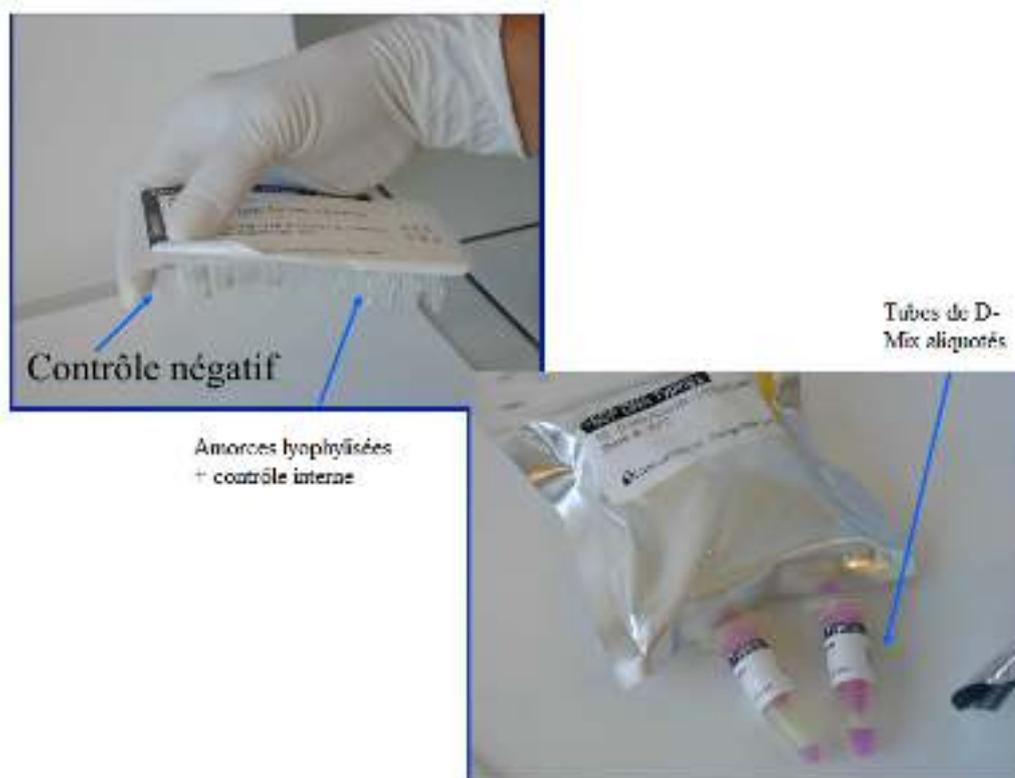


Figure 11:préparation des plaques à PCR-SSP

DQB1* 05	DQB1* 06	DQB1* 02	DQB1* 02,03,0 6,08	DQB1*0 3,07,08	DQB1* 02,08,0 9,03,04	DQB1*0 7,08,09,0 3	DQB1*0 4
DRB1 *01	DRB1* 01,03	DRB1* 15	DRB1* 16	DRB1* 3,17,18, 11	DRB1*0 3,17,11 ,13,14	DRB1*0 3,18,11,1 3,14	DRB1*0 4

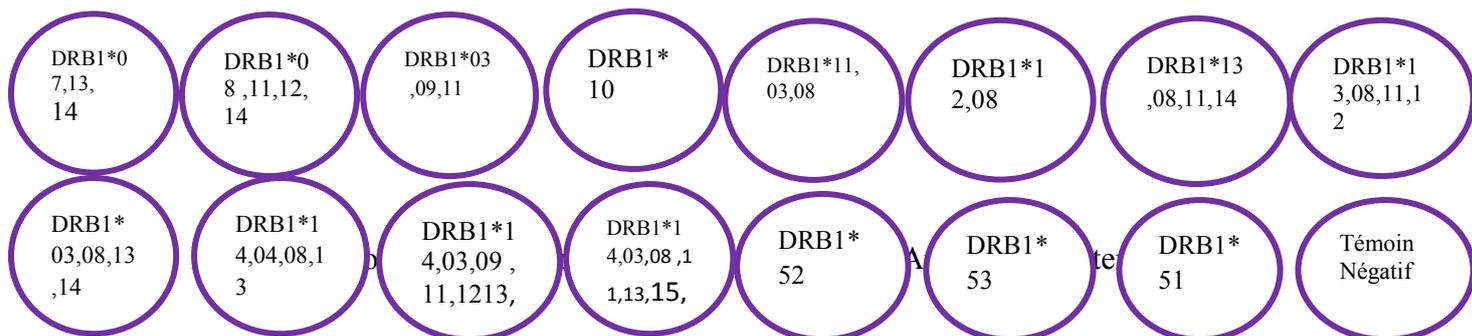


Figure12 : Les différents cibles des gènes HLA classe II (DQB1 et DRB1) .

Réalisation de PCR:

-Bien fermer la plaque à l'aide de l'adhésif et la placer dans le thermocycleur.

-Poser dessus le tampon de pression et fermer le thermocycleur et lancer le programme PCR.

Le typage HLA a été réalisé pour 19 patients présentant une MC, avec une plaque pour chaque patient.

Tableau 3: le programme d'amplification

Etapes	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	96°C	02min	1cycle
Dénaturation	96°C	15s	10cycles
Hybridation- Elongation	65°C	60s	
Dénaturation	96°C	10s	20cycles
Hybridation	61°C	50s	
Elongation	72°C	30s	
Elongation terminale	4°C	07min (∞)	

Electrophorèse sur gel d'agarose:

- Préparation du gel :

-Prendre 1,25g d'agrose en poudre et lui rajouter 50ml de tampon tri-borate EDTA.

-Placer le mélange dans le micro-onde pendant 3 à 4 min.

-faire sortir le mélange de micro-onde et lui rajouter quelques gouttes de bromure d'éthidium (sous hotte).

-Couler le mélange sur la plaque de migration et laisser refroidir quelques secondes .

-Placer les empreintes sur la plaque de migration pendant quelques minutes.

-Enlever les empreintes de la plaque et l'émerger par un tampon PCR qui permet le passage de courant électrique entre l'anode et la cathode.

La plaque est alors prête à l'emploi.

- Migration sur gel :

-Les produits d'amplification sont transférés dans les 32 puits de la plaque de migration par une pipette multi canaux.

-Couvrir la boîte à électrophorèse et brancher sur le générateur. La migration se fait à 140 volts pendant 4 minute.

II.3.2.4.3. Interprétation des résultats : selon le tableau ci-après et les figures

- **L'amplification positive** montre la présence de 2 bandes. Une bande contrôle correspondant à l'allèle du gène de l'hémoglobine humaine et une bande de l'allèle HLA classe II DR et DQ
- **L'amplification négative** montre la présence uniquement d'une seule bande du contrôle interne

Tableau4: Interprétation des résultats

	Réaction positive	Réaction Négative	Indéterminé
Puits			
Contrôle Interne			
Contrôle Spécifi			

III.1. RESULTATS

III.1.1. L'ensemble des MICI recueillis

Dans notre étude, nous avons recensé 190 patients atteints de MICI dont 11 cas de forme familiale retrouvé dans 5 familles. Les 190 cas de MICI incluent 102 cas de maladie de Crohn (MC) soit 53,68%, et 88 cas de RCH (46,31%).

III.1.2. Répartitions globales des patients atteints de MICI selon le sexe

En fonction du sexe des patients, les 190 cas de MICI recensés peuvent être réparti comme suit:

Tableau 5: répartition des patients atteints de MICI selon le sexe

MICI	Hommes		Femmes	
	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage
Maladie de Crohn	60	59%	42	41%
Recto-colite hémorragique	48	55%	40	45%
Total	108	57%	82	43%

Le graphe suivant illustre cette tendance :

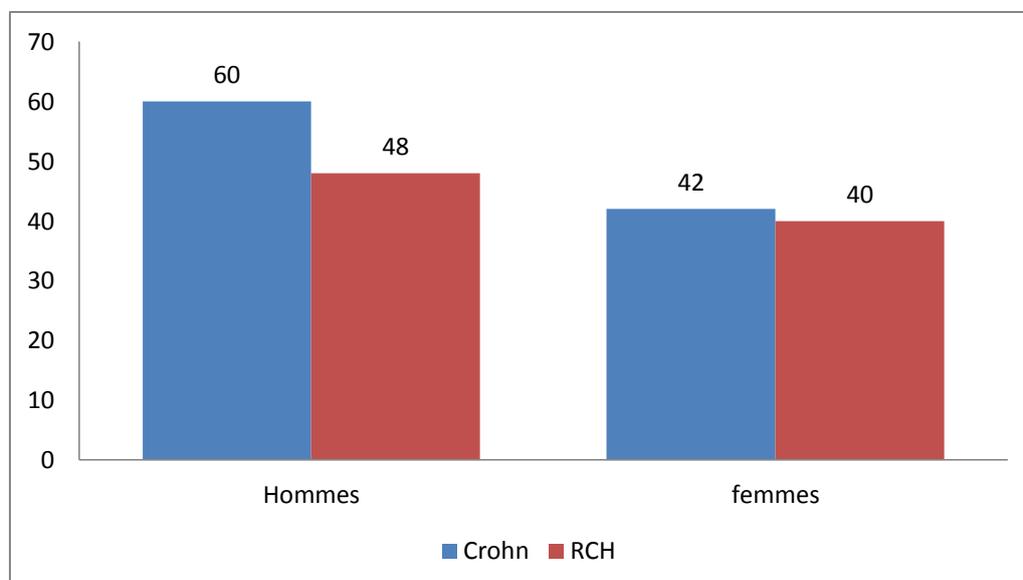


Figure 14: répartition des patients atteints de MICI selon le sexe

Le **tableau 05** et la **figure 14** nous montrent que les hommes sont les plus atteints par les MICI soit au total 108 hommes atteints dont 60 de MC et 42 de RCH représentant respectivement 59% des MC et 55% des RCH. Parmi les 82 femmes atteintes des MICI, 42 souffrent de la MC et 40 de la RCH.

III.1.3. Répartition des patients atteints de MICI par tranche d'âge

II.1.3.1. Répartition des patients atteints de la maladie de Crohn par tranche d'âge

Le **tableau6** et la **figure15** nous montre la répartition par tranche d'âge des malades atteints de la Maladie de Crohn tandis que le **tableau7** nous montre la moyenne d'âge général de ces patients.

Tableau 6: répartition des patients de la maladie de Crohn par tranche d'âge

Classes d'âges	15-19		20-29		30-39		40-49		50-59		60-69		Total	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Effectif	4	2	27	14	17	22	09	04	03	00	00	00	60	42
pourcentage	3,90	2	26,50	13,70	16,70	21,60	8,80	3,90	2,90	00	00	00	58,80	41,20

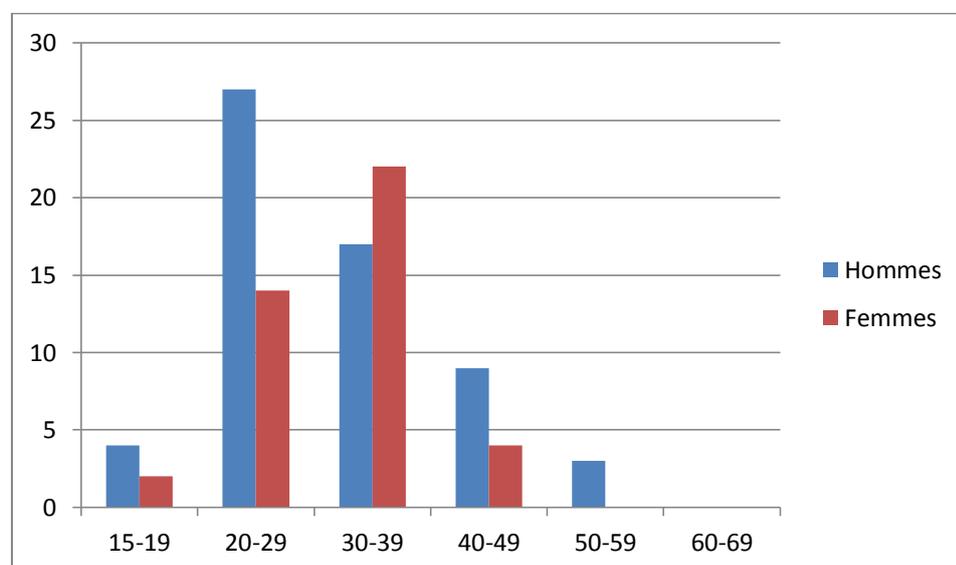


Figure 15: répartition de la maladie de Crohn par tranche d'âge

Le tableau et la figure précédents nous montrent que la Maladie de Crohn touche pratiquement toutes les tranches d'âge avec une prédominance chez les sujets entre 20-29 ans et 30-39 ans ou nous notons respectivement 41 cas (27 (26,5%) hommes et 14 (13,70%) femmes) et 39 cas (17 (16,70%) hommes et 22 (21,60%) femmes). Les personnes âgées de la tranche d'âge de 60-69 ans ne sont pas du tt atteints.

Tableau7 : Moyenne d'âge des personnes atteintes de la Maladie de Crohn

Sexe	Moyenne d'âge	Taille de l'échantillon
Masculin	31,80	60
Féminin	31,80	42

Le **tableau7** nous instruit que l'âge moyen des personnes atteintes de la maladie de Crohn est de 31,80 ans aussi bien chez les hommes que chez les femmes.

III.1.3.2. Répartition des patients atteints de RCH par tranche d'âge

Tableau 8 : Répartition des patients atteints de RCH par classes d'âge

Tranche d'âges	15-19		20-29		30-39		40-49		50-59		60-69		Total	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Effectif	01	01	22	27	17	11	04	00	01	01	03	00	48	40
Pourcentage	1,10	1,10	25	30,70	19,30	12,50	4,50	00	1,10	1,10	3,40	00	54,40	45,50

La prédominance de la pathologie dans les troisième et quatrième décades de la vie est trouvée dans la RCH soit 49 (22 (25%) hommes et 27 (30,70%) femmes) personnes atteintes ayant entre 20-29 ans et 28 (17 (19,30%) hommes et 11 (12,50%) femmes) ayant entre 30-39ans, on note une apparition de la RCH dans la septième décade (60 à 69ans) de la catégorie masculine. Ces constatations sont par ailleurs illustrées dans le graphique suivant :

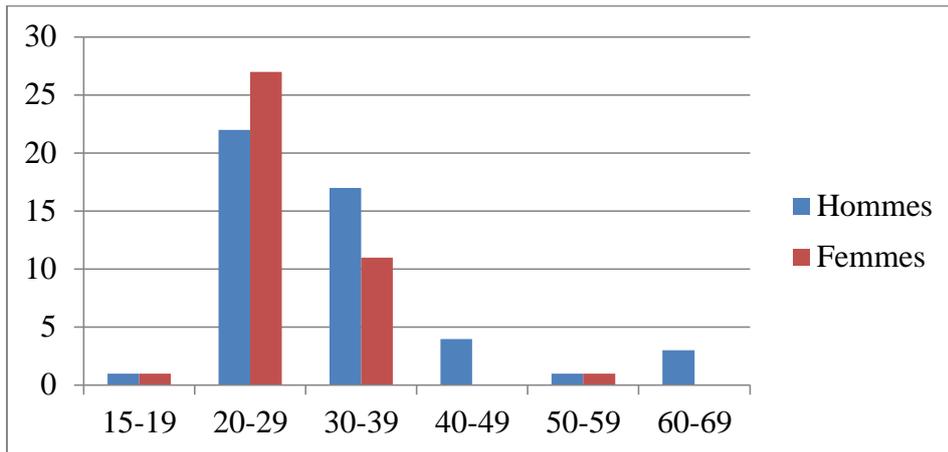


Figure 16: Répartition des patients atteints de RCH par classes d'âge

Tableau 9 : Moyenne d'âge des patients atteints de la Recto-volite-Hémorragique

Sexe	Moyenne d'âge	Taille de l'échantillon
Masculin	33,1	48
Féminin	28,3	40

Le **tableau 9** nous montre que l'âge moyen des hommes atteints de RCH est de 33,1 ans tandis que celui des femmes est de 28,3 ans.

III.1.4. Répartition des formes familiales des MICI

Le choix des familles s'est basé sur la présence de nombreux individus de la fratrie qui sont atteints d'un des deux maladies inflammatoire chronique de l'intestin (MC ou RCH)

Parmi les 190 cas de MICI recensés, l'étude a permis de déceler 11 personnes (soit 5 familles) atteintes de forme familiale. Ces familles se répartissent en: 2 atteintes de MC (4 personnes) et en 3 atteintes de RCH (7 personnes). Le schéma suivant illustre cette tendance.

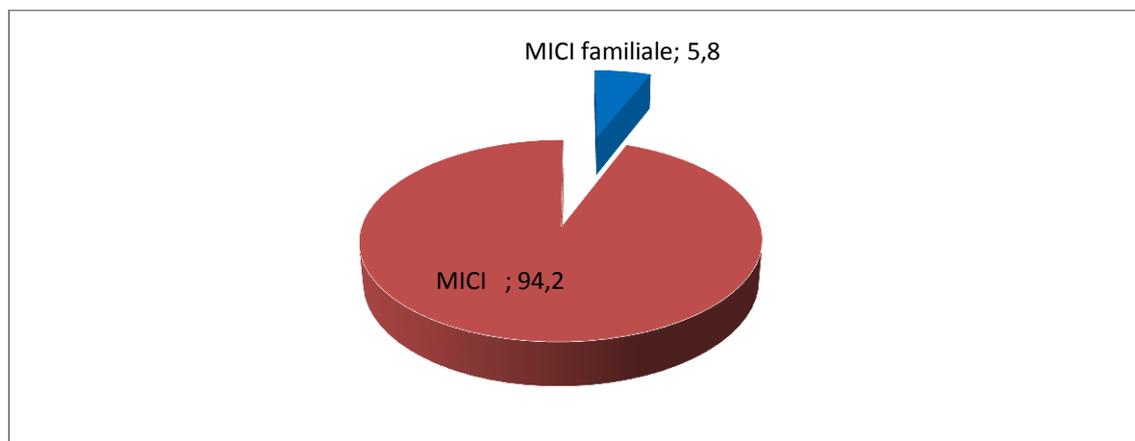


Figure 17: schéma qui illustre la tendance des formes familiales.

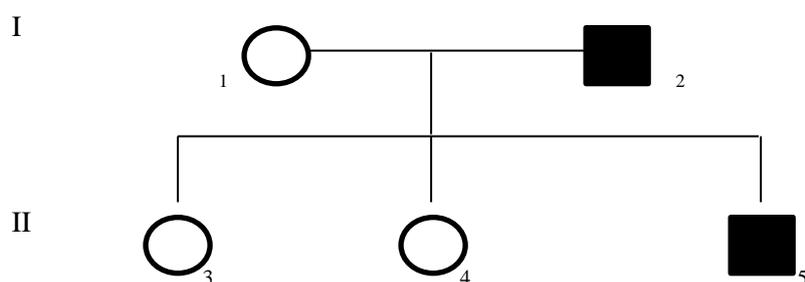
La figure précédente nous montre que 5,80% (11 personnes) des personnes atteintes de MICI présentent une forme familiale.

III.1.4.1 Les arbres généalogiques des formes familiales :

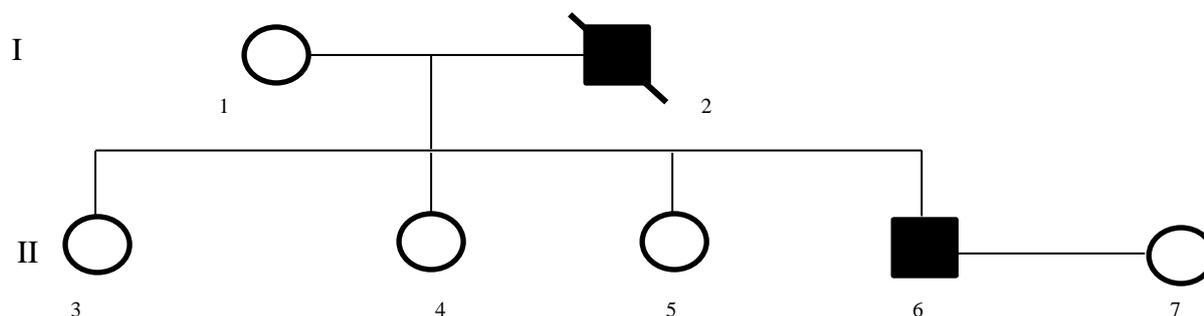
Après l'enquête génétique qu'on a établie à l'aide de la fiche d'exploitation, on a pu édifier les arbres généalogiques des 5 familles atteintes de la forme familiale de MICI.

III.1.4.1.1 MALADIE DE CROHN

1^{er} famille:

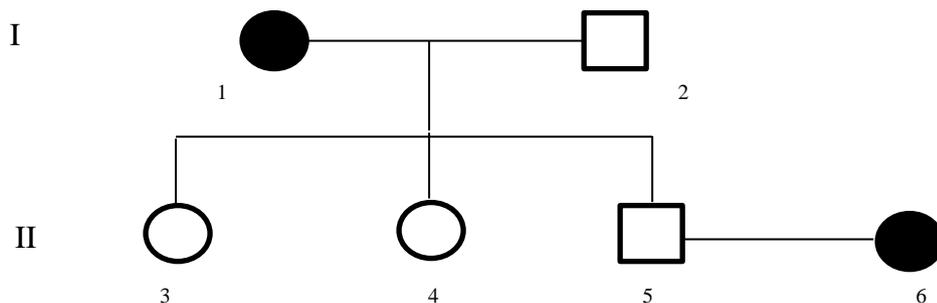


2^{eme} famille:

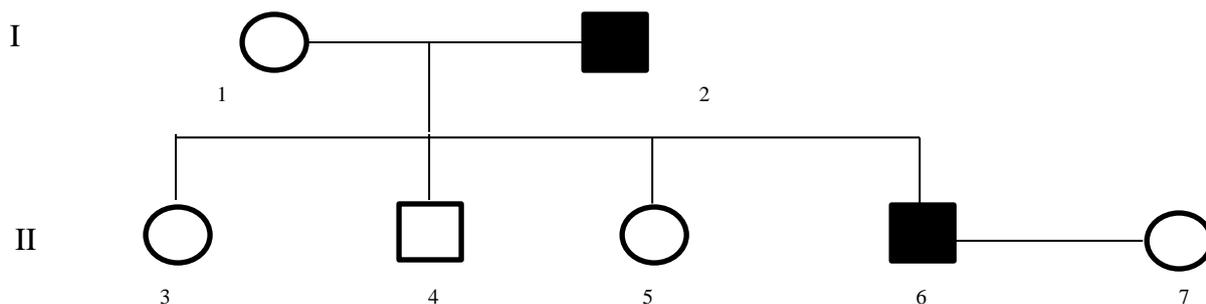


III.1.4.1.2. RECTO-COLITE-HEMORRAGIQUE

3^{ème} famille:



4^{ème} famille:



5^{ème} famille:

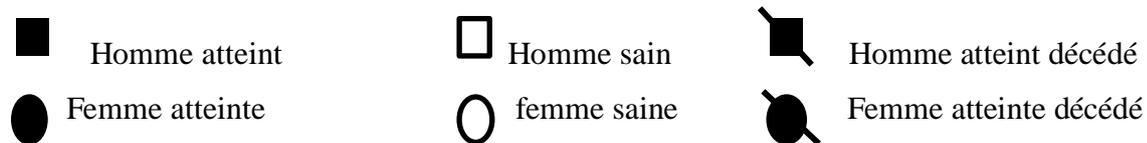
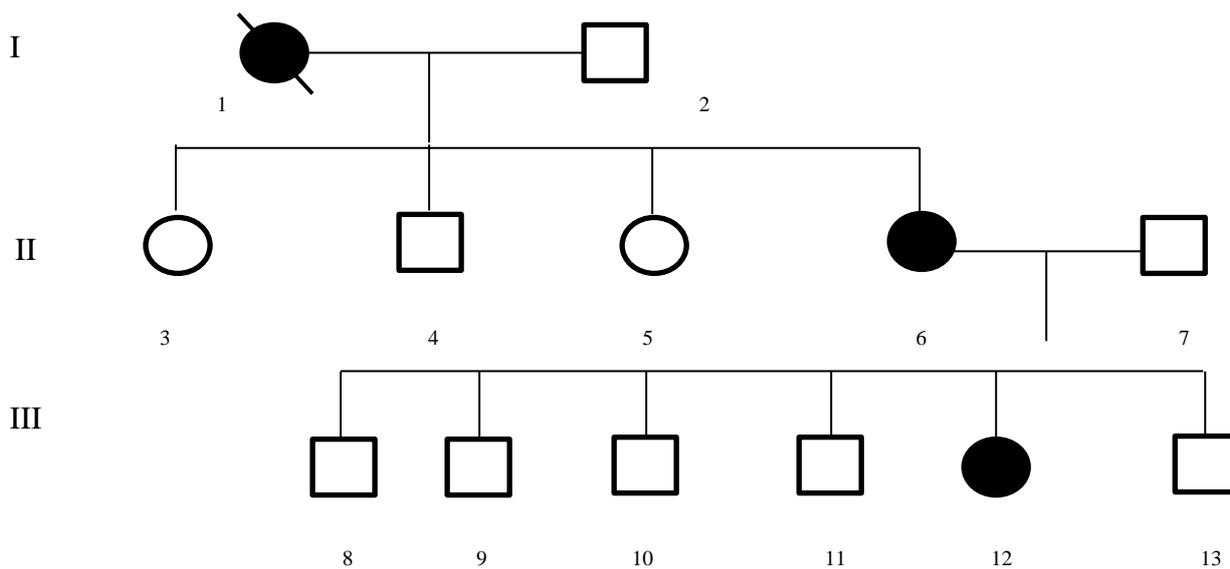


Figure 18 : arbres généalogiques des familles atteintes de la forme familiale de MICI

La figure 18 nous présente les arbres généalogiques des 5 familles atteintes des formes familiales de MICI

1^{ère} famille: deux personnes sont atteintes de la MC dans cette famille, ce sont 2 hommes.

2^{ème} famille: 2 hommes sont atteintes de la MC dans cette famille, le père est décédé.

3^{ème} famille: Dans cette famille, les 2 personnes atteintes de la RCH sont des femmes

4^{ème} famille : Les personnes atteintes dans cette famille sont des hommes au nombre de 2.

5^{ème} famille : Dans cette famille, 3 cas de RCH sont décelés, touchant essentiellement les femmes. On note le décès de la mère de la première génération.

III.1.5. Etude moléculaire

Au cours de ce travail, parmi les 190 patients dénombrés, seulement 19 personnes atteintes de MC ont acceptés d'être soumis au reste de nos investigations ; consistant au typage HLA.

Nous notons l'absence de forme familiale parmi ces cas.

III.1.5.1 Résultats de la biologie moléculaire

- **Contrôle quantitatif de l'ADN**

Une analyse du génome des patients atteints de la maladie inflammatoires chroniques de l'intestin par biologie moléculaire est faite après extraction d'ADN des échantillons des patients et des témoins selon la technique de Kit Quiagen. Cette dernière se révèle être une technique rapide, facile et non toxique.

Les résultats de l'analyse quantitatif du génome des patients atteints est résumé dans le tableau suivant :

Tableau 10: concentration des ADN des Patients

N° Patients	Concentration d'ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	N° Patients	Concentration d'ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1	27.3	11	36.6
2	14.1	12	39.6
3	27.6	13	21.8
4	19.2	14	21.7
5	28.6	15	33.7
6	19.6	16	35.7
7	36.3	17	33.7
8	27.0	18	41.5
9	20.4	19	20.8
10	23.23		

Le contrôle de l'extraction de l'ADN par spectrophotométrie nous montre que les échantillons présentent des concentrations moyennes de 14,1 à 41,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ et un rapport de DO compris entre 1,5 et 2 (**Tableau10**).

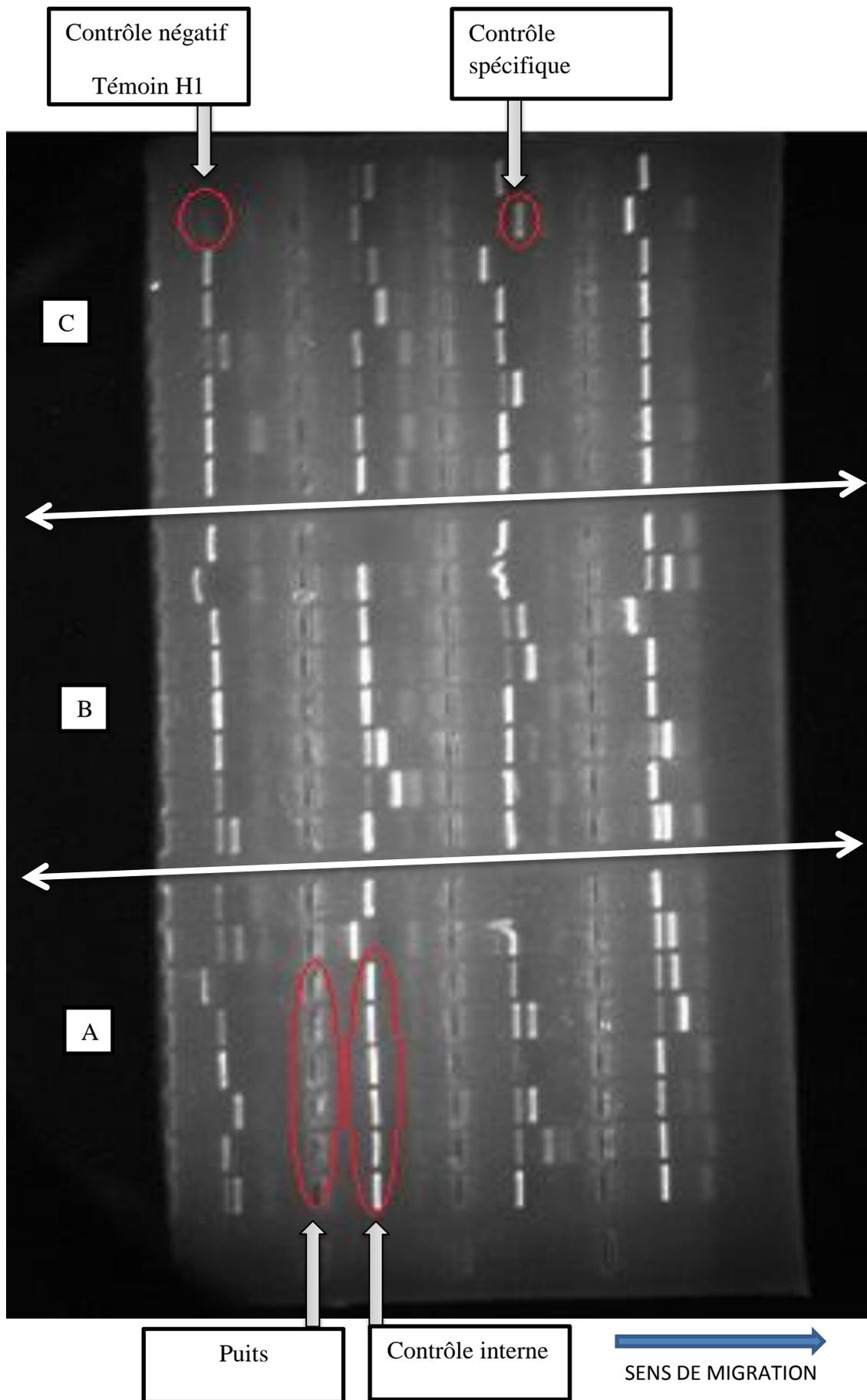


Figure 19: Contrôle de la PCR-SSP sur gel d'agarose pour 3 patients.

III.1.5.2. Typage générique des allèles HLA DRB1* et DQB1***Tableau 11:** Fréquence des allèles HLA DRB1* et HLA DQB1* chez les patients MC et les témoins

Allèle HLA classe II	MC N= 19				Témoins
	2N=38 n(%)	P	OR	χ^2	
Allèle HLA DRB1*					2N=40 n(%)
DRB1*01	4(10,53)	0,19	2,24	0,24	2 (5)
DRB1*03	3(7,89)	0,17	0,49	0,39	6 (15)
DRB1*04	2(5,26)	0,14	0,39	0,52	5 (12,5)
DRB1*07	5(13,16)	0,41	0,86	0,00	6 (15)
DRB1*08	1(2,63)	0,48	1,05	0,00	1 (2,5)
DRB1*09	1(2,63)	0,23	Infinity	0,001	0 (0)
DRB1*10	0(0%)	0,25	0,00	0,00	1 (2,5)
DRB1*11(05)	5(13,15)	0,33	1,36	0,007	4 (10)
DRB1*12(05)	2(5,25)	0,28	2,17	0,002	1 (2,5)
DRB1*13(06)	7(18,42)	0,24	1,58	0,16	5 (12,5)
DRB1*14(06)	0(00)	0(00)	0(00)	0(00)	0 (00)
DRB1*15(02)	5(13,15)	0,3	0,71	0,047	7 (17,5)
DRB1*16(02)	3(7,89)	0,16	3,34	0,32	1 (2,5)
Allèle HLA DQB1*	2N=38 n(%)	Pc	OR	χ^2	2N=40 n(%)
DQB1*02	10(26,32)	0,033	3,21	2,5	4 (10)
DQB1*03	15(39,47)	0,39	0,88	0,002	17 (42)
DQB1*04	1(2,63)	0,11	0,24	0,74	4 (10)
DQB1*05(01)	7(18,42)	0,43	0,9	0,00	8 (20)
DQB1*06(1)	5(13,16)	0,3	0,71	0,047	7 (17,5)

Le **tableau 11** nous montre que le typage HLA a concerné les variant alléliques HLA-DRB1* (de 01 à 16) et HLA-DQB1* (de 02 à 06). Elle nous montre également des pourcentages élevés de fréquence de certains allèles HLA comparé à ceux des témoins dont DRB1*01 ; DRB1*11 ; DRB1*13 ; DRB1*16 et DRQB1*02. Ces résultats sont illustrés dans les figures suivantes en comparaison aux valeurs témoins.

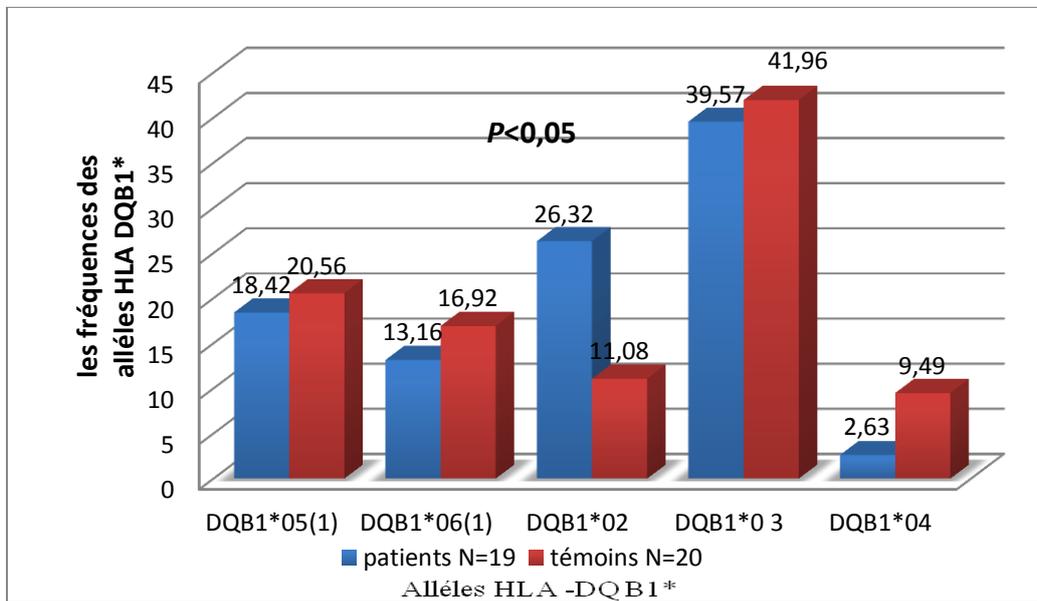


Figure 20: comparaison des fréquences des allèles HLA DQB1* chez les patients MC et les témoins

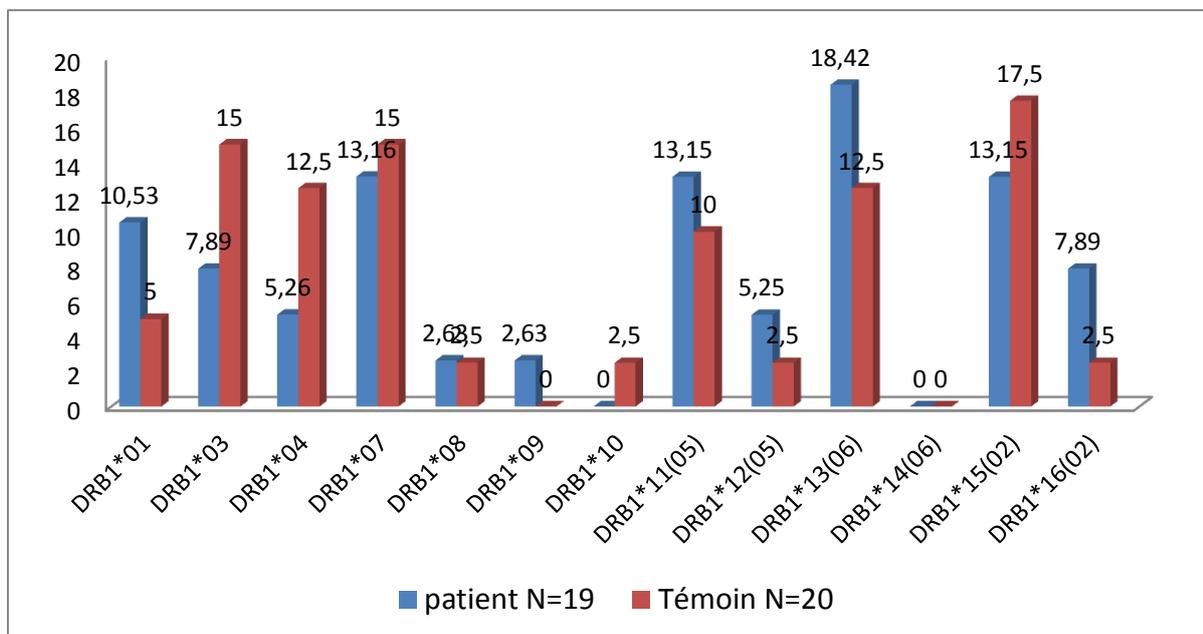


Figure 21 : comparaison des fréquences des allèles HLA DRB1* chez les patients MC et les témoins

III.2. DISCUSSION

Au cours de notre travail, nous étions confrontés aux problèmes suivants :

- La difficulté de joindre les anciens malades.
- Des dossiers incomplets
- Le refus de la plupart des malades de coopérer dans le cadre de notre étude (il y'a que 19/190 personnes qui ont accepté d'y adhérer).
- Le manque de matériel (réactifs, appareillage ...).
- On n'a pas pu inclure de forme familiale dans notre étude pour les raisons précédentes

Ces points semblent utiles d'être rappelés en début d'analyse des résultats de cette étude.

Dans notre étude, le nombre de patient atteint de MC, 102 (53,68%) est plus élevé que ceux qui présentent une RCH, 88 (46,32%).

En effet, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont répandues dans tous les continents mais avec des prévalences différentes en fonction des régions. L'incidence de la Maladie de Crohn est plus faible que celle de la Recto-colite Hémorragique mais à tendance à augmenter (sans modification de sa localisation) dans certains pays. Un rapprochement a été établi entre l'augmentation de fréquence de la MC depuis la seconde guerre mondiale et la diffusion du mode vie occidentale. L'une des causes liées à l'augmentation de la MC est la consommation du tabac (**Cortot et al., 1993**). Une cause qui expliquerait probablement le nombre élevé de personnes atteintes de la Maladie de Crohn dans notre étude vu le degré de consommation de tabac en Algérie.

Globalement, nous notons qu'il existe au vu des résultats une différence notable dans les proportions basées sur le sexe des patients, ce qui se caractérise par une proportion plus élevée des hommes 57% qui sont plus concernés que les femmes dont la proportion touchée ne représente que 43%

Nous remarquons dans cette étude que la répartition des deux maladies n'est pas liée au tranche d'âge, les MICI n'épargnent aucune tranche d'âge. On observe une prédominance de malades chez les sujets jeunes de la deuxième et de la troisième décennie avec pour âge moyen de 31,8 ans pour les personnes atteintes de MC et 33,1 ans (homme) et 28,3 ans (femme) pour les personnes atteintes de RCH. Dans ce sens, **Cortot et al., 1993** disent qu'une incidence maximale de MICI est constatée chez les adultes jeunes entre 20 et 35ans et que dans certaines

étude, un deuxième pic d'incidence plus tardif a été observé dans la RCH. Un pic que nous avons constaté également dans nos résultats par l'atteinte des personnes de la septième décennie (60-69ans). Il est à noter qu'il existe des cas pédiatriques dans la maladie de Crohn et que cette maladie est le plus souvent diagnostiquée à un âge entre 20 et 30 ans. Il s'agit d'une maladie cryptogénétique, où différents facteurs sont retrouvés et discutés (prédisposition génétique, facteurs immunologiques et environnementaux) (**Haute Autorité de Santé, 2008**)

C'est dès 1934 que le Docteur Crohn décrivait une forme familiale de la maladie de Crohn et actuellement 8 à 10% des sujets atteints de cette maladie ont un ou plusieurs parents atteints (**Mennecier, 2011**). Dans notre cas, on dénote 5 familles atteintes de MICI de forme familiales impliquant 11 (5,80%) personnes.

Depuis la découverte de *NOD2/CARD15*, de nombreux gènes ont été associés aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, impliqués entre autres, dans la réponse immunitaire innée et l'élimination des bactéries (autophagie) débouchant sur de nouvelles hypothèses physiopathologiques dont l'élément clé est la microflore intestinale (**Cortot et al., 2009**). Le rôle physiologique de NOD2 serait lié à la reconnaissance des lipopolysaccharides bactériens. La protéine NOD2, produit de transcription du gène, est un puissant activateur du facteur de transcription NF-kB, facteur pro-inflammatoire activant les cellules mononuclées de la lamina propria intestinale. Enfin, les chercheurs ont découvert qu'une mutation du gène NOD2, due à l'insertion d'une base cytosine, serait responsable de 15 % des cas de MC . Le gène muté coderait pour une protéine NOD2 tronquée qui n'activerait plus le facteur NF-kB (**Castel et al., 2001**). Mais attention ce gène présente des mutations chez seulement 50% des malades et tout de même chez 20% des sujets sains. Le gène n'est donc ni nécessaire ni suffisant pour que la maladie s'exprime (**Mennecier, 2011**).

L'analyse allélique du polymorphisme HLA DRB1* montre une fréquence élevée de l'allèle HLA-DRB1*13 chez les malades par rapport aux témoins avec comme valeurs respectives : (18,42% vs 13,2%, OR= 1,58, Pc=0,24), cependant la fréquence des allèles DRB1*03 et DRB1*04 est plus élevée chez les témoins par rapport aux malades sans différence significative avec comme valeurs respectives : DRB1*04(5,25% VS 12,5%, OR=0,39 ,Pc=0,14) et DRB1*03 (5,26 vs 15% ,OR=0,49, Pc=0,17) (**Tableau 11**).

Toutefois l'analyse de la fréquence allélique du polymorphisme HLA DQB1* montre une différence significative de l'allèle HLA-DQB1*02 entre les malades par rapport aux témoins avec comme valeurs respectives : (26 .32% vs 11 .08%, OR= 3 .21, Pc=0.033).

CONCLUSION

Dans ce travail, nous nous sommes proposé de faire une étude génétique des maladies inflammatoires chroniques intestinales qui sont des affections caractérisées par une inflammation chronique de l'intestin.

Dans un premier temps, nous avons fait une étude statistique portant sur 190 patients incluant des formes familiales et des formes sporadiques. Etant donné que les MICI sont associés à certains types HLA, nous avons donc, procédé dans un deuxième temps, dans le cadre d'une étude moléculaire, au typage de 19 patients atteints de MC. Le

typage HLA consiste à identifier les antigènes caractéristiques de l'individu. Certains types HLA sont souvent associés à certaines maladies, dont les MICI. Le typage d'un individu est considéré comme un critère diagnostic moléculaire important.

Depuis l'avènement de la technique de PCR, la diversité génétique a été étudiée au niveau de l'ADN génomique par des techniques de la biologie moléculaire. Nous avons opté pour la PCR-SSP (Séquence Spécifique Primer).

Le typage HLA a concerné les variant alléliques HLA-DRB1* (de 01 à 16) et HLA-DQB1 (de 02 à 06).

L'analyse de la fréquence allélique du polymorphisme HLA-DQB1* montre une différence significative de l'allèle HLA-DQB1*02 entre les malades par rapport aux témoins, par contre, celle du polymorphisme HLA-DRB1* montre une fréquence élevée de l'allèle HLA-DRB1* 13 chez les malades par rapport aux témoins.

Il est important de procéder à la généralisation de la technique de typage HLA dans les populations à risque dans le cadre de la prévention contre les maladies inflammatoires chroniques intestinales pour faire un dépistage précoce de ces maladies et une meilleure prise en charge des patients.

References bibliographies :

Bodmer, J.G., Marsh, S.G.E., Albert, E.D., Bodmer, W.F., Bontrop, R.E., Dupont, B., Erlich, H.A., Hansen, J.A., Mach, B., Mayr, W.R., Parham, P., Petersdorf, E.W., Sasazuki, T., Schreuder, G.M.Th., Strominger, J.L., Svejgaard, A., Terasaki, P.I.(1998)

Calkins, B.M. (1989) A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.*, 34, 1841-1854.

Calkins, B.M. and Mendeloff, A.I. (1986) EPIDEMIOLOGY OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE. *Epidemiol Rev*, 8, 60-91.

Carpentier R, Farge D(1992).*Transplantation d'organes. Paris, Medecine-Sciences Flammarion.*

Ch. Florent. Place de l'endoscopie dans le diagnostic, l'évaluation et le suivi des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)*Actaendoscopica* October 2006, Volume 36, Issue 5, pp 655-670.

Dalziel, T.K. (1989) Thomas Kennedy *Dalziel* 1861-1924. Chronic interstitial enteritis. *Dis Colon Rectum*, 32, 1076-1078.

Dr H.Hassikou: Service de médecine interne de l'hôpital Moulay Ismaïl Meknès Maroc. Publié Juin 2013

E. Israeli, I. Grotto, B.Gilburdet. al. antisaccharomycescervisiae and antineutrophil cytoplasmic antibodies as predictors of inflammatory bowel disease *gut* 2005 ; 54 :1232e6.

Farmer RG. Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol* 1980; 9:271-277.

Fielding, J.F. (1988) Crohn's disease and Dalziel's syndrome. A history. *J ClinGastroenterol.*, 10, 279-285.

Garnier, S., Dieude, P., Michou, L., Barbet, S., Tan, A., Lasbleiz, S., Bardin, T., Prum, B. and Cornelis, F. (2006) The systemic lupus erythematosus new genetic factor IRF5 rs2004640-T allele is not linked to, nor associated with rheumatoid arthritis, in a family-based study from the French caucasian population. *Ann Rheum Dis*, ard.2006.061390.

Geboes, K., Ceuppens, J.L. and Rutgeerts, P. (2002) Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 97, 2000-2004.

Hammada T, Lemdaoui MC, Boutra F, Zoughailech H, Asselah H.(2011) Epidemiological aspects of inflammatory bowel disease in an Algerian population. *J.Afr.Hépatol.Gastroenterol*; 5: 293-302.

Harris N. (2004) *Nat Rev Immunol*; 4:478-485.

Hugot, J.P., et al., Prevalence of CARD15/NOD2 mutations in Caucasian healthy people. *Am J Gastroenterol*, 2007. 102(6): p. 1259-67.

Jean-aide Zeitoun-jérémie LEFEVRE Ariane CHRYSSOSTALIS. (2013) hépato-Gastro enterologie chirurgicale viscerale N°118 maladie de crohn et rectolite hémorragique.

Jones, D.T ; Osterman, M.T. ; Bewtra, M ; Lewis, J.D. (2008). Passive Smoking and Inflammatory Bowel Disease : A Meta-analysis . *Am J Gastroenterol*, 103 (9), pages 2382-2393

Kahn M-F, Peltier A-P, Meyer O, Piette J-C (2000). Maladies et syndromes systémiques. *Médecine- Sciences- Flammarion*, 39-42.

Klein J, Sato A (2000) *The HLA system. Second of two parts. N Engl J Med*; 343: 782-790

Kobayashi, K.S., et al., Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*, 2005. 307(5710): p. 731-4.

Lamoril, J, Deybach J and Bouizegarèneb P. (2007) Genetic aspects of crohn's disease: a review. *Immuno-analyse et bio spécialisée*, 22(3):137-150.

Maeda, S., et al., Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science*, 2005. 307(5710): p. 734-8.

Orchard TR, Wordsworth B, Jewell D. The peripheral arthropathies on inflammatory bowel disease: their articular distribution and natural history. *Gut* 1998;42:387-391.

O. Dewit, R. Fiase, R. Vanheuverzwyn. Apport de l'endoscopie dans la maladie de Crohn. *Acta Endoscopica* April 2003, Volume 33, Issue 2, pp 217-231.

Philpott, D.J. and S.E. Girardin, Crohn's disease-associated Nod2 mutants reduce IL10 transcription. *Nat Immunol*, 2009. 10(5): p. 455-7.

R. Madigliani, J.P Gendre. Rectocolite hémorragique. In Rambeud JC, ed. *Traité de gastro-entérologie*. Paris : Flammarion, 2000 : 607-624.

Rei S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997 ; 40 : 754-60.

Rotter JL. Genetics of inflammatory bowel disease. In : Targan SR, Shanahan F. Eds. *Inflammatory Bowel Disease. From Bench to Beside* : Williams and Wilkins, 1994 ; 32-64.
Dewit, O., de Vos, M., Dixon, A., et al. (2007) Novel Crohn Disease Locus Identified by Genome-Wide Association Maps to a Gene Desert on 5p13.1 and Modulates Expression of PTGER4. *PLoS Genet.*, 3, e58.

S. Shivananda, J Lennard-Jones, R Logan, N Fear et al. : the EC-IBD Study Group Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference

between north and south? Results of the European collaborative study on inflammatory bowel disease (EC-IBD), *Gut* 1996; 39: 690-697.

Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins : a study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988; 29: 990-7.

Watts, A.D., Hunt, N.H., Madigan, M.C. and Chaudhri, G. (1999) Soluble TNF-alpha receptors bind and neutralize over-expressed transmembrane TNF-alpha on macrophages, but do not inhibit its processing. *J LeukocBiol*, 66, 1005-1013.

Williams H, Walker D, Orchard TR. Extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *CurrGastroenterol Rep*.2008;10:597-605.

Yamamoto-Furusho, J.K. and D.K. Podolsky, Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 2007. 13(42): p. 5577-80.