



Dr. Mohamed ELABKARI
Professeur Agrégé
Hépatologie - Gastro - Entérologie
Proctologie
CHU Hassan II - Fès

كلية الطب والصيدلة
+053526011 +0151151 8 +060X01
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

**Prévalence de la mutation NOD2/CARD15 chez les
patients porteurs d'une maladie de Crohn
Une étude prospective au centre hospitalier
universitaire de Fès**

MEMOIRE PRESENTE PAR :
Docteur ZAHRA BOUHNOUN

**POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE SPECIALITE EN MEDECINE
OPTION : Hépatologie-Gastro-entérologie et proctologie**

**Sous la direction de: Professeur MOHAMED ABKARI
Membre associé : Pr HAKIMA ABID**

Sesslon Juillet 2020



**Prévalence de la mutation NOD2/CARD15 chez les
patients porteurs d'une maladie de Crohn
Une étude prospective au centre hospitalier
universitaire de Fès**

MEMOIRE PRESENTE PAR :

Docteur ZAHRA BOUHNOUN

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE SPECIALITE EN MEDECINE

OPTION : Hépto–Gastro–entérologie et proctologie

Sous la direction de: Professeur MOHAMED ABKARI

Membre associé : Pr HAKIMA ABID

Session Juillet 2020

PLAN

PLAN	2
INTRODUCTION	4
MATERIEL ET METHODES.....	8
A. Les critères d'inclusion :	9
B. Le déroulement de l'étude :	10
C. Analyse statistique :	13
RESULTATS.....	16
A. Données épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques	17
B. Résultats de l'étude génétique	20
DISCUSSION	24
CONCLUSION.....	37
RESUME.....	39
BIBLIOGRAPHIE	43

INTRODUCTION

Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), en pratique maladie de Crohn (MC) et rectocolite hémorragique (RCH), sont des inflammations chroniques du tube digestif atteignant exclusivement le rectum et le colon pour la RCH et tout le tube digestif avec une prédilection pour la région iléo-cæcale pour la MC. Les MICI ne sont pas rares et si on considère l'incidence par année et l'espérance de vie actuelle, la probabilité d'en développer une au cours de la vie est de 1%.[1]

L'hypothèse physiopathologique actuellement suggère la présence des interactions entre des prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux – notamment la flore intestinale – qui entraîne des lésions inflammatoires responsables des dégâts anatomiques. L'activation immunitaire se ferait sous l'influence d'antigènes bactériens et serait modulée par des facteurs d'environnement potentiellement multiples (figure 1) [2]. A ce jour, seuls le tabagisme et l'appendicectomie ont été reconnus comme influençant le risque d'apparition des MICI et leur évolution, même si leurs mécanismes d'action restent inconnus [3-4].

La fréquence des formes familiales de MICI ainsi que la concordance pour la maladie de Crohn observée chez les jumeaux homozygotes illustrent par ailleurs l'importance du terrain génétique [5]. C'est en 1996, qu'un criblage large du génome humain identifia un locus possédant une liaison forte avec la maladie de Crohn [6]. Le gène NOD2 (Nucleotide Oligomerisation Domain 2, aussi appelé CARD15 et NLR-C2), sur le chromosome 16, a été le premier gène de susceptibilité identifié pour la MC par cette approche. En 2001, 3 mutations du gène NOD2, à savoir R702W (Arg702 Trp), G908R (Gly908Arg) ainsi qu'une insertion de cytosine (3020 insC), ont été identifiées entraînant un risque de développer la maladie de Crohn [7-8]. Ces

mutations ont été décrites surtout dans la population caucasienne.

En ce qui concerne la population marocaine, il existe peu de données sur la prévalence de cette susceptibilité génétique. Une seule étude déjà réalisée dans l'unité de génétique médicale du centre hospitalier universitaire (CHU) Ibn Sina portée sur 101 patients atteints de la maladie de Crohn et 107 témoins sains a montré que ces trois principales variantes du gène NOD2 étaient présentes chez les patients sans différence significative par rapport aux témoins[9]

L'objectif de cette étude est de déterminer la prévalence des trois principales variantes de la mutation NOD2/CARD15 chez les patients porteurs de la maladie de crohn, de rechercher une relation entre les caractéristiques phénotypiques de la maladie et la présence de cette mutation. Dans cette perspective, notre travail a été soumis pour obtention d'une bourse de recherche à la société marocaine des maladies de l'appareil digestif, ce qui a permis de le primer pour une bourse de recherche en 2010.

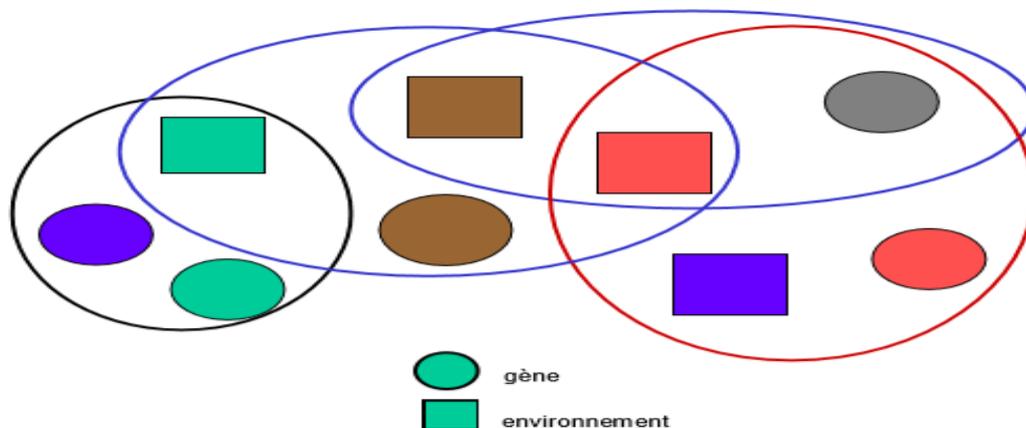


Figure 1. Modèle de maladie génétique complexe applicable aux MICI.

La maladie est symbolisée par un ovale. La variabilité de l'expression clinique (couleur de l'ovale) est en partie dépendante des facteurs étiologiques. Ceux-ci sont variables d'un malade à l'autre et combinent des facteurs génétiques (cercles) et environnementaux (carrés) en nombres variables. Les facteurs de risque génétiques ou environnementaux sont symbolisés par des ronds et des carrés de couleur différente. [3]

MATERIEL ET METHODES

Il s'agit d'une étude prospective entamée en janvier 2011 jusqu'au Décembre 2019, au service d'hépatogastroentérologie au CHU Hassan II de Fès. Le but de cette étude est de préciser la prévalence de la mutation du gène NOD2/CARD15 chez les patients atteints de maladie de Crohn d'une population marocaine. Cette étude était réalisée en collaboration avec l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU HASSAN II.

A. Les critères d'inclusion :

Un ensemble de critères d'inclusions a été retenu par le groupe d'étude, à savoir :

- Patients âgés de plus de 16 ans, suivis au service d'hépatogastroentérologie du CHU HASSAN II de FES pour maladie de crohn,.
- Le diagnostic de la maladie de crohn était retenu sur un ensemble de critères cliniques, endoscopiques, radiologiques, histologiques et évolutifs.
- Le recrutement des patients s'est fait à travers la consultation bihebdomadaire spécialisée des MICI, et le registre des patients hospitalisés dans le service d'hépatogastroentérologie.

B. Le déroulement de l'étude :

Au début de l'étude, le groupe de travail s'est réuni à plusieurs reprises pour l'élaboration du protocole d'étude, la réalisation et la validation du CRF (case report form) et de la charte de l'étude.

1. Prélèvement des patients :

Tous les patients éligibles avaient bénéficié d'un prélèvement sanguin sur deux tubes d'EDTA, après avoir reçu des explications sur les procédures et les objectifs de l'étude, et après avoir signé un consentement éclairé (Figure 1).

Les prélèvements étaient ensuite acheminés au laboratoire de génétique où ont eu lieu les étapes d'extraction et de séquençage de l'ADN.

2. Constitution d'une DNA thèque des patients atteints de la MC.

3. Extraction d'ADN par kit et par sel :

L'extraction de l'ADN (acide désoxyribonucléique) est une technique qui isole de l'ADN à partir d'une cellule en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse.

a. Extraction de l'ADN par sel :

- ❖ On commence en général par une lyse des cellules ou des tissus, consistant éventuellement en un broyage, suivi d'une extraction par des détergents, qui vont disperser les bicouches lipidiques des membranes et dénaturer les protéines, et en particulier celles qui sont associées à l'ADN dans la chromatine. La solution obtenue est en général très visqueuse, car l'ADN ainsi libéré forme de très longs filaments qui s'opposent aux écoulements hydrodynamiques.
- ❖ L'étape suivante est la déprotéinisation de la solution qui se fait par une extraction au moyen de solvants organiques, en général du phénol

additionné de plus ou moins de chloroforme. Les protéines dénaturées forment un précipité à l'interface phénol-eau, tandis que l'ADN reste en solution dans la phase aqueuse qui est récupérée par décantation ou par centrifugation.

- ❖ L'ADN est ensuite précipité par addition d'éthanol ou d'isopropanol dans la phase aqueuse, collecté par centrifugation et dissous dans du tampon. Pour éliminer les traces de phénol et d'autres contaminants, on peut enfin pratiquer une dialyse ou une étape de purification par chromatographie.

b. Extraction de l'ADN par kit :

L'extraction par kit est une technique simple et rapide qui permet d'obtenir un ADN plus pur ce qui va influencer la réussite des techniques en aval. Pour cette étude on a utilisé le kit INVITROGEN

4. Dosage de l'ADN:

La concentration en ADN de l'échantillon est estimée par spectrophotométrie. En effet, les acides nucléiques présentent un pic d'absorption dans l'ultra-violet. Le maximum de cette absorption se situe à 260nm. Un ADN est considéré pur lorsqu'il présente un rapport DO260 / DO280 comprise entre 1.8 et 2.

5. Amplification des séquences nucléotidiques par PCR.

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

- Pour avoir la réplication d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes.
 - (1) dénaturation de l'ADN pour obtenir des matrices simple brin,
 - (2) hybridation des amorces spécifiques,
 - (3) réalisation de la réaction de polymérisation du brin complémentaire par l'enzyme polymérase.

- A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin.

Dans notre étude, Nous avons effectué le génotypage pour les trois variantes p.Arg702Trp, p.Gly908Arg et p.Leu1007fsinsC du gène NOD2 et ceci en séquençant les exons 4; 8 et 11 du gène NOD2

6. Séquençage du produit PCR :

Avant de procéder au séquençage des produits PCR, il faudra les purifier pour éliminer l'excès d'amorces, dNTP et d'ADN polymérase et ceci en 3 réactions essentielles :

1^{ère} réaction : purification par ExoSAP® :

ExoSAP-IT est conçu pour une purification rapide et efficace des produits de PCR. Il comporte deux enzymes hydrolytiques, l'exonucléase I(Exo) qui dégrade les ADN simples brins et la phosphatase alcaline de crevette (SAP) qui hydrolyse les dNTPs libres, et en excès sans interférence avec les applications en aval. Les fragments simples brins inférieurs à 100pb sont ainsi dégradés.

2^{ème} Réaction de séquence par BigDye® Terminator v3.1 Cycle :

Sequencing : Cette réaction se fait selon la méthode de Sanger qui repose sur l'incorporation aléatoire par l'ADN polymérase de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) eux aussi présents dans le milieu réactionnel et dont chacun est marqué par un fluorophore à spectre d'émission spécifique. Une analyse spectrale va ainsi différencier les différents fluorochromes associés à la base correspondante

et donc définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial.

3^{ème} réaction : purification de la réaction de séquence avec le Kit BigDye

XTerminator : Le kit BigDye® Xterminator™ permet la purification des produits de réaction de séquence en capturant les dyes non incorporés dans la réaction, les sels et autres molécules chargées qui pourraient interférer lors de la détection des bases par séquenceur.

Le kit contient :

- un flacon "SAM Solution" (stockage à T° ambiante)
- un flacon: « XTerminator Solution (stockage à 4°C, ne pas congeler)

Les plaques peuvent être conservées 7 jours à 4°C (pas congelées) avant d'être analysées avec le séquenceur.

Les séquences d'ADN sont déterminées par séquençage automatique (séquenceur à 16 capillaires 3500DS Genetic Analyser AppliedBiosystem) au niveau de l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique au CHU Hassan II de Fès.

C. Analyse statistique :

- Les données des patients ont été recueillies à l'aide d'une fiche pré établie.
(Figure 2)

الاسم الشخصي

الاسم العائلي

قرار المريض crohn

اقرأ الموقع أدناه..... موافقتي الإرادية على المشاركة من أجل دراسة الجينات

لمرض

حرر في

بتاريخ:

التوقيع :

قرار الطبيب

اقرأ الطبيب أنني شرحت بالقدر الوافي للمريض طبيعة هذه الدراسة والهدف

منها وانه وافق بمحض إرادته .

حرر في

بتاريخ:

التوقيع

Figure 1 : Fiche de consentement éclairé pour l'étude de la mutation NOD2/CARD15 chez les patients porteurs d'une MI

Figure2 : Fiche d'exploitation : Prévalence de la mutation NOD2/CARD15 chez les patients porteurs d'une maladie de crohn. Etude prospective au CHU Hassan II Fès.

DATE D'INCLUSION |__|_| |__|_| |__|_| TEL du patient.....
 NOM : PRENOM : DATE DE NAISSANCE |__|_| |__|_| |__|_|
 AGE |__|_| ans SEXE : Masculin · Féminin · ORIGINE : MILIEU : · U · R
 AGE DE DECOUVERTE DE LA MALADIE : |__|_| ans, DATE DE DECOUVERTE DE LA MALADIE |__|_|_|_|_|

<p>ANTECEDENTS MEDICO-CHIRURGICAUX :</p> <p>1. Tabagisme</p> <p>2. Consanguinité :</p> <p>4. ATCD de MICI familiale. Si oui, lien de parenté :</p> <p> a- Premier degré :</p> <p> Père, mère, frère, sœurs, enfant</p> <p> b- Deuxième degré :</p> <p> Oncle, tante, neveux, cousin</p> <p> c- Siège de l'attente du parent :</p> <p> Iléo colique, Iléo caecale, duodénum, MAP</p> <p>5. ATCD de maladie articulaire familiale : Oui, non</p> <p>Si oui, lien de parenté.....</p> <p>6. autres antécédents :</p>	<p>LOCALISATION DE LA MALADIE :</p> <p>a- grêle.</p> <p>b- Colon</p> <p>c- Anale</p> <p>d- Gastrique</p> <p>e- Duodénale,</p> <p>f- Carrefour iléo-cæcal</p> <p>g- Autres :.....</p>
<p>CLINIQUE</p> <p>1. Symptômes révélateurs :</p> <p>a. Douleurs abdominales</p> <p>b. Diarrhées chroniques</p> <p>c. Rectorragies</p> <p>d. Anémie</p> <p>e. Dysenterie</p> <p>f. Atteinte ano-périnéale</p> <p>g. Vomissements</p> <p>h. Syndrome anémique</p> <p>i. Fièvre</p> <p>j. Koenig.</p> <p>2. Manifestations extradigestives :</p> <p>a- Articulaires b- Cutanées</p> <p>c- Ophtalmologiques</p>	<p>FORME DE LA MALADIE :</p> <p>1- Luminale</p> <p>2- Sténosante</p> <p>3- Fistulisante</p> <p>4- anopérinéale .</p> <p>PROFIL EVOLUTIF :</p> <p>a. Nombre de poussées par an : .../an</p> <p>b. Forme cortico dépendante</p> <p>c. Forme cortico résistance</p> <p>d. Forme chronique active</p> <p>e. Maladie en rémission</p>
<p>Activité de la maladie :</p> <p>a- Poussée minime ;</p> <p>b- Poussée modérée ;</p> <p>c- Poussée sévère ;</p> <p>d- Colite aigue grave.</p>	<p>Maladie en rémission sous :</p> <p>a. Salicylés</p> <p>b. Corticoïdes</p> <p>c. Budosénide</p> <p>d. Azathioprine</p> <p>e. 6-mercaptopurine</p> <p>f. Méthotrexate</p> <p>g. Infliximab</p> <p>h. Chirurgie</p>
<p>Profil génétique :</p> <p>Mutation NOD 2/CARD15 : NON ou Oui, sur quel Exon ? : Exon 4, Exon 8, Exon 11</p> <p>Polymorphisme génétique : oui non si oui quel type :</p>	

RESULTATS

A. Données épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques

Cent soixante-treize patients atteints de la maladie de Crohn ont été inclus dans l'étude. L'âge moyen était de 34.9ans [17-74 ans]. Le sexe ratio F/H était de 1.54. Soixante-dix-neuf pour cent des patients provenaient d'un milieu urbain. Un antécédent de tabagisme était retrouvé chez 12 % des cas, et une MICI familiale chez 5% des cas.

La maladie était révélée par des diarrhées chroniques chez 109 patients (63%), par des douleurs abdominales chez 67 patients(60%) dont 48 cas sous forme de syndrome de Koenig (28%), elle était diagnostiquée devant un syndrome dysentérique chez 48 patients (28%), devant des manifestations ano périnéales dans 32 cas (19%) et devant des signes digestifs hauts à type de vomissement dans 15 cas (Figure3) :

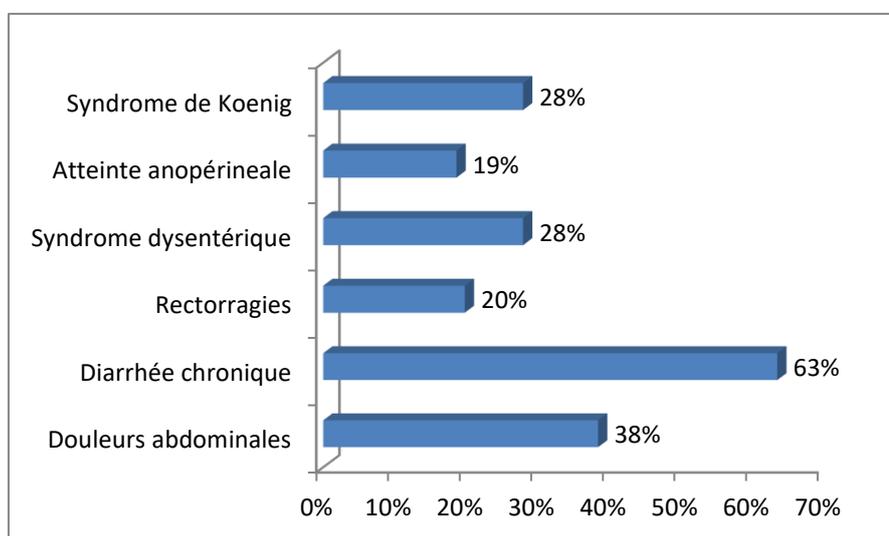


Figure 3 : Circonstance de découverte

Vingt-cinq (14%) patients avaient une poussée minime, 46% des patients avaient une poussée modérée, tandis 27% des patients avaient une poussée sévère. Une colite aigue grave était le mode de révélation de la maladie chez 6 patients (Figure 4).

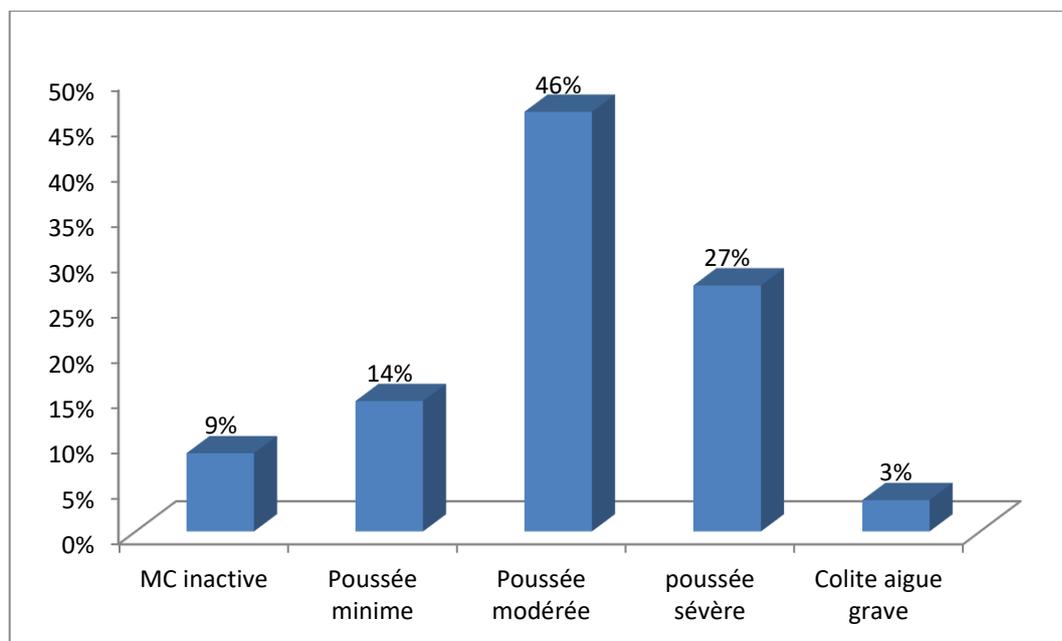


Figure 4: Activité de la Maladie de crohn

Cinquante-cinq patients (32%) avaient des manifestations articulaires associées, huit patients (5%) avaient des manifestations cutanées et neuf patients (5%) avaient des manifestations ophtalmologiques (Figure 5).

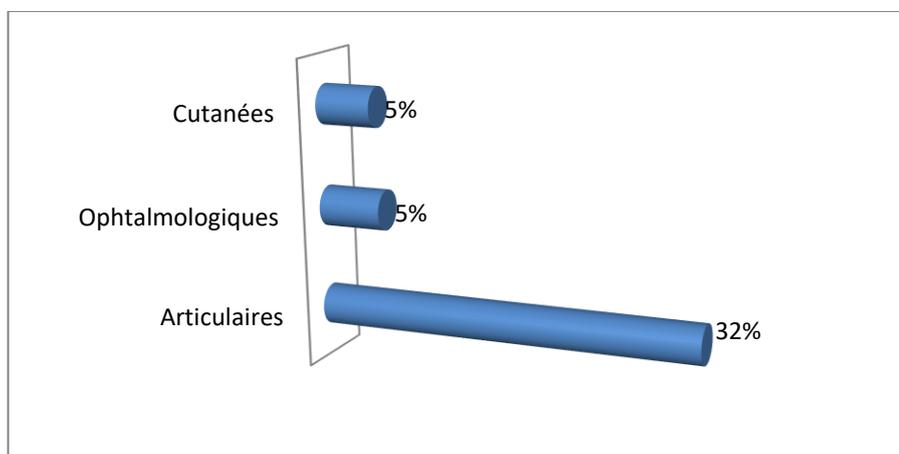


Figure 5 : manifestations extradiigestives.

Soixante-quatre patients (37%) avaient une localisation iléo colique, et 55 patients avaient une localisation colique isolée (32%) et la localisation gastrique de la maladie était notée chez 2 cas. (Figure 6)

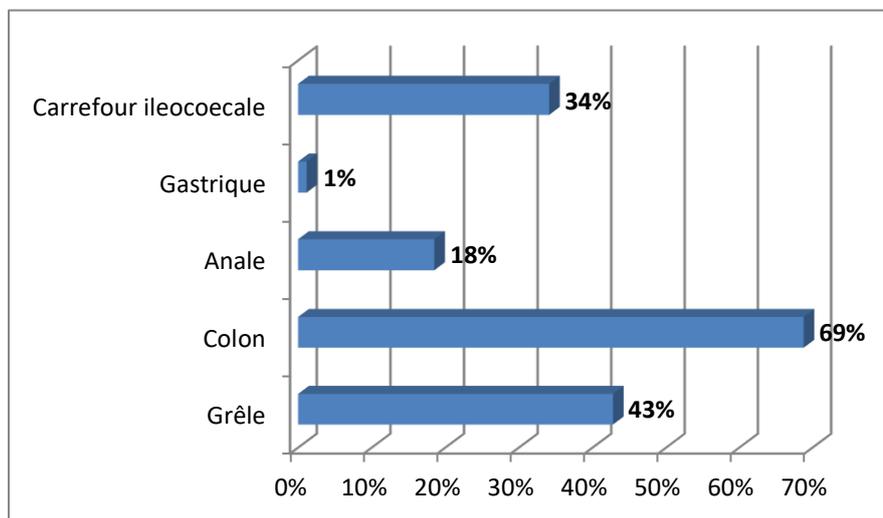


Figure 6: Localisation de la maladie.

La maladie était luminale seule chez 69 patients (40%), sténosante chez 23 patients (13%), fistulisante chez 44 patients (24%) et ano-périnéale chez cas 35 (20%) (Figure 7).

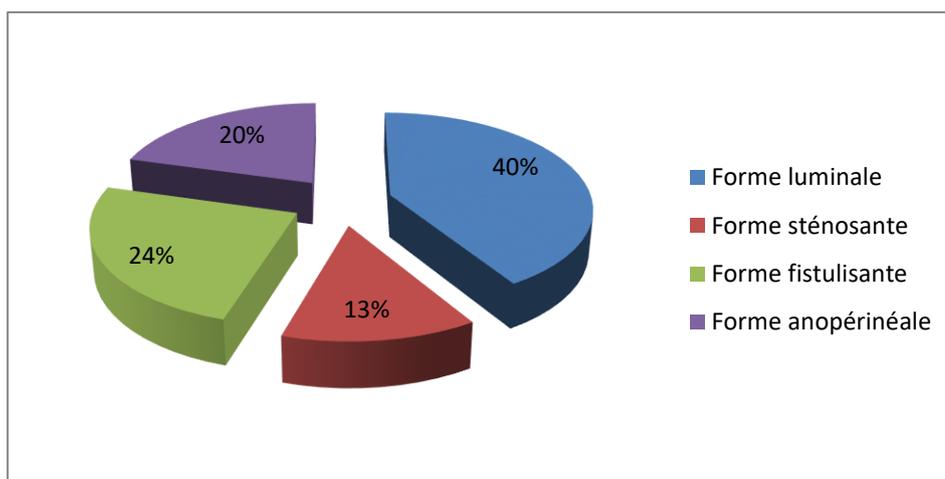


Figure 7: forme de la maladie

Trente-six pour cent des patients avaient recours à la chirurgie (N=63), 60% étaient sous immuno suppresseurs (N=103), et 15 % étaient sous anti TNF (N=26).

B. Résultats de l'étude génétique :

Dans notre série, les trois principales mutations décrites du gène NOD2/CARD15 :

- p.Arg702Trp située sur l'exon 4 était présente chez 2 patients
- p.Gly908Arg située sur l'exon 8 était présente chez 2 patients
- p.Leu1007fsinsC située sur l'exon 11, était absente chez tous les patients (Figure 8, 9, 10). (Tableau1)

Par ailleurs, l'alignement des séquences des exons 4, 8 et 11 a montré la présence d'un polymorphisme c.2753C-A (p.Ala918Asp) au niveau de l'exon 8 chez 2 patients (Figure 11), d'un polymorphisme c. 2105G-C (p.Gly702Asp) au niveau de l'exon 4 chez 2 patient et d'un polymorphisme c.3020ins-C au niveau de l'exon 11 chez 2 patients.(Tableau 2)

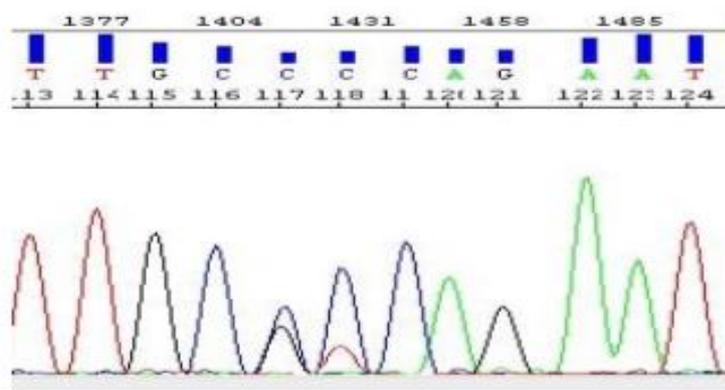


Figure8 : Mutation du p.Gly908Arg (c.2722G-C) sur l'exon 8 chez deux patients porteurs de la maladie de crohn

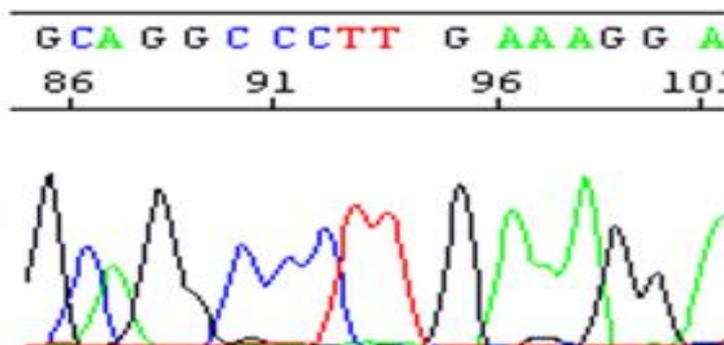


Figure9 : Mutation du p.Leu 100fsinsC (c.3020insC) sur l'exon 11 chez deux patients porteurs de la maladie de crohn.

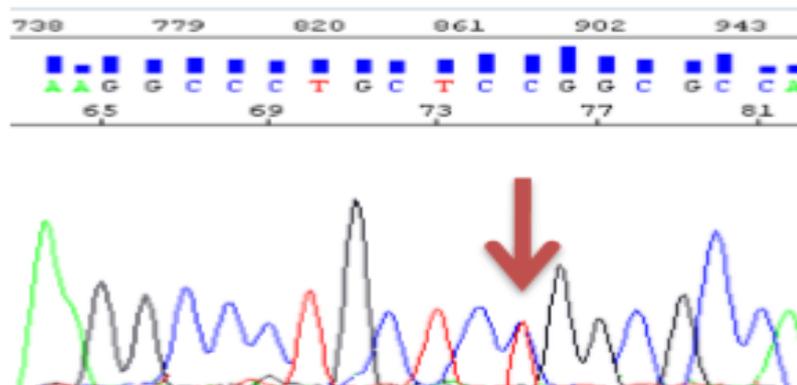


Figure10 : Mutation du p.Arg702Trp (c.2104C-T) sur l'exon 4 chez deux patients porteurs de la maladie de crohn.

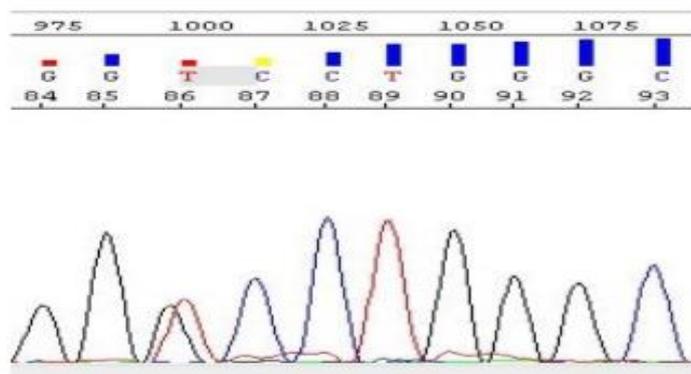


Figure 11 : polymorphisme c.2753C–A sur l'exon 8 chez deux patients porteurs de la maladie de crohn.

Tableau1 : Caractéristique phénotypiques chez les patients porteurs deux variantes (R702W, G908R) au niveau du gène NOD 2 /CARD 15.

Variantes Caractéristiques phénotypiques	R702W		G908R	
	Exon	4		8
Patients	Patient 1	Patient 2	Patient 1	Patient 2
Age de découverte	53	29	30	24
Sexe	Féminin	Féminin	Masculin	Féminin
ATCD familiaux de MICI	Non	Non	Non	Non
Circonstances de découverte	Bilan de SPA	Abcès appendiculaire	Diarrhée chronique	Diarrhée chronique
Manifestations extradigestives	oui	non	Non	Non
Localisation de la maladie	Atteinte colique luminale	Carrefour iléo-caecale forme sténosante	Atteinte colique et grêlique luminale	Atteinte colique sténosante avec MAP
Activité de la maladie	Inactive	En rémission après chirurgie	Forme chronique Active	Forme chronique active

Tableau 2: Caractéristiques phénotypique chez les patients porteur de la MC avec présence d'un polymorphisme.

Type de Polymorphisme	c.2753C-A (p.Ala 918Asp)		c2105G-C (p.Gly702Asp)		c2030-C (Leufs100)	
Caractéristiques phénotypiques						
Exon	8		4		11	
Patients	Patient 1	Patient 2	Patient 1	Patient 2	Patient 1	Patient 2
Age de découverte	32	29	30	24	17	22
Sexe	F	F	M	F	M	F
ATCD familiaux de MICI	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Circonstances de découverte	Diarrhée chronique	Diarrhée chronique	Diarrhée chronique	Diarrhée chronique	Douleurs abdominales	Douleurs abdominales
Manifestations extradigestives	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Localisation de la maladie	Atteinte colique et grêlique luminale	Atteinte iléo-caecale sténosante	Atteinte colique et grêlique luminale	Atteinte colique sténosante avec MAP	Atteinte iléo colique sténosante fistulisation avec MAP	Attente iléo-caecale sténosante et fistulisante
Activité de la maladie	Forme chronique active	Forme chronique active	Forme chronique active	Forme chronique active	Forme chronique active	En rémission sous traitement
Autres	-	Maladie cœliaque associées	-	-	-	-

Chez les 4 patients porteurs de la mutation NOD 2/CARD15 deux patients présentent une atteinte sténo sante. Aussi bien pour les polymorphismes observés, nous avons noté également le caractère sténosant de la maladie chez 4 patients parmi six patients porteurs d'un polymorphisme.

DISCUSSION

L'hypothèse étiologique actuelle des MICI est multifactorielle complexe, survenant chez des individus génétiquement prédisposés, au cours desquelles une réponse immunitaire muqueuse anormale vis-à-vis de la microflore intestinale survient, ce qui entraîne une inflammation de la muqueuse intestinale. Cette inflammation est déclenchée ou aggravée par des facteurs environnementaux [1]. (Figure 12)

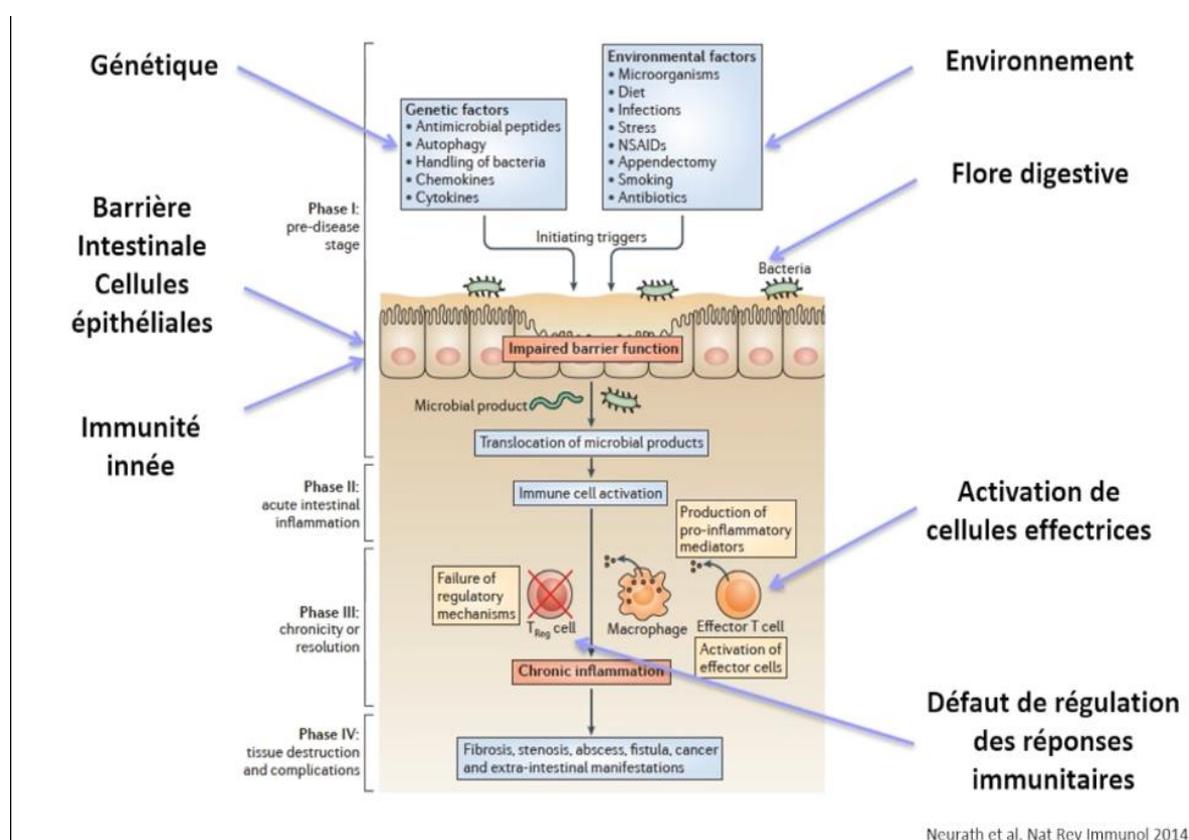


Figure 12 : physiopathologie complexe des MICI [10]

La fréquence des formes familiales de MICI ainsi que la concordance dans 50 à 60% pour la maladie de Crohn observée chez les jumeaux homozygotes et des prévalences différentes selon les groupes ethniques, représentent des arguments témoignant de l'importance du terrain génétique dans les MICI [5-11-12]. Ainsi plusieurs études pangénomiques et ciblées ont permis d'identifier plusieurs gènes

de susceptibilité aux MICI mais les estimations de la contribution de ces gènes à l'héritabilité suggèrent que plusieurs gènes restent à découvrir [13]. Ces études de criblage du génome publiées récemment, ayant permis de localiser avec une forte probabilité neuf gènes de prédisposition aux MICI sur les chromosomes 1, 3, 5, 6p, 12, 14, 16p, 16q et 19.[14]

Sur le chromosome 16, des variations génétiques sur le gène NOD2 ont été initialement rapportées par deux groupes indépendants comme étant associées à la MC[15–16], et ensuite validées par de nombreuses études[17–18]. D'une manière générale, ces études avaient permis de conclure que NOD2 était un gène majeur de la MC.

Le gène NOD 2 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2) aussi appelé CARD15 (Caspase recruitment domain 15) est le premier gène identifié et le plus étudié à l'heure actuelle[15]. Il a été découvert conjointement par deux équipes européennes et américaines en 2001 par étude de liaison génétique sur des familles atteintes de MC (15–16]. La localisation chromosomique du gène NOD2 est située en 16q12, dans la région péricentromérique du chromosome 16 (locus IBD-1). Le gène NOD2 code une protéine intra-cytoplasmique composée de 1044 acides aminés, comportant trois portions fonctionnelles : La partie C terminale de la protéine contient un domaine riche en Leucine LRR (Leucine Rich Repeat) :caractérisée par une reconnaissance bactérienne, puis la partie médiane de la protéine : caractérisée par la protéine NOD (Nucleotide-binding and Oligomerization Domain) qui est impliquée dans l'auto-oligomérisation et en fin, la partie N-terminale de la protéine, contenant deux domaine CARDs (Caspase Recruitment Domain), connus par leur rôle dans l'apoptose et dans les voies d'activation NF- κ B (Figure 13).

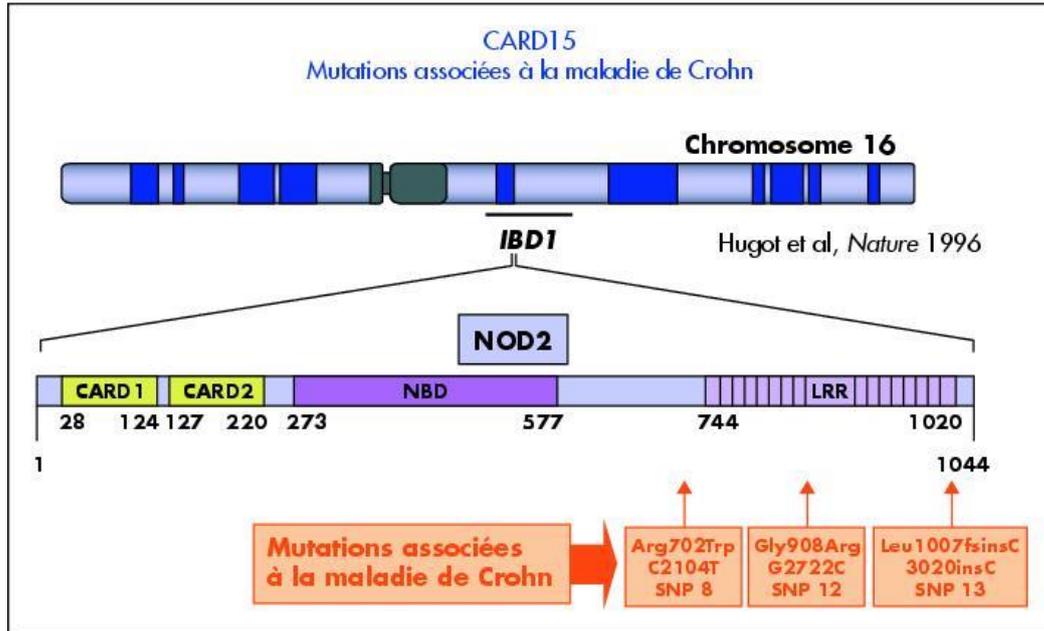


Figure 13 : Structure du gène et de la protéine NOD2/CARD15 [6]

La protéine NOD2 fait partie de la super-famille des PRR (Pathogen Recognition Receptor). On distingue trois grandes familles de PRR : les TLR (Toll Like Receptors) situés dans la membrane cellulaire, les RLR (Retinoic acid inducible gene1 Like Receptors) impliqués dans la reconnaissance des virus, et les NLR (NOD-like Receptors). 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.

D'un autre côté, il est reconnu que l'épithélium intestinal est assez « poreux » et il existe une interaction permanente entre la flore microbienne intestinale et le système immunitaire de la muqueuse. Dans les conditions normales, la flore intestinale ne provoque pas de réaction inflammatoire. En cas de déficit d'activité de NOD2/CARD15 (Immunité inné), une réaction importante de TLR2 (régulé par NOD2) aux ligands des bactéries commensales initierait au moins en partie une réaction inflammatoire [19].

L'identification du gène NOD2/CARD15 qui correspond comme nous l'avons vu précédemment à un récepteur de reconnaissance de la flore intestinale, a placé l'immunité innée au cœur de la physiopathologie des MICI[20–21]. Les familles des Toll-like récepteurs (TLR) et des récepteurs NOD (famille NLR) font partie d'un système de reconnaissance qui intervient en première ligne dans la défense anti-infectieuse de l'organisme et joue un rôle clé dans l'immunité innée. Ils sont exprimés par les cellules épithéliales et cellules de Paneth. Les TLR et les NLR possèdent un domaine enrichi en leucine (domaine LRR), qui permet la reconnaissance spécifique de motifs moléculaires portés par certains composants des bactéries pathogènes ou commensales tels que le lipopolysaccharides (LPS), le muramyl dipeptide (MDP), le peptidoglycane, la flagelline. [22–23–24]

Dans le cadre de l'immunité innée, les récepteurs NOD et TLR jouent un rôle dans l'activation cellulaire par la voie NFκB et synergisent l'apoptose cellulaire par la voie des caspases. L'expression des TLR est modifiée au cours de la MC avec une diminution de TLR3 et une surexpression de TLR4. Le TLR9 est également présent à la surface des cellules épithéliales des patients atteints de MC et induit une sécrétion d'IL-8 en réponse directe à des antigènes bactériens.[22–23–24](figure 14)

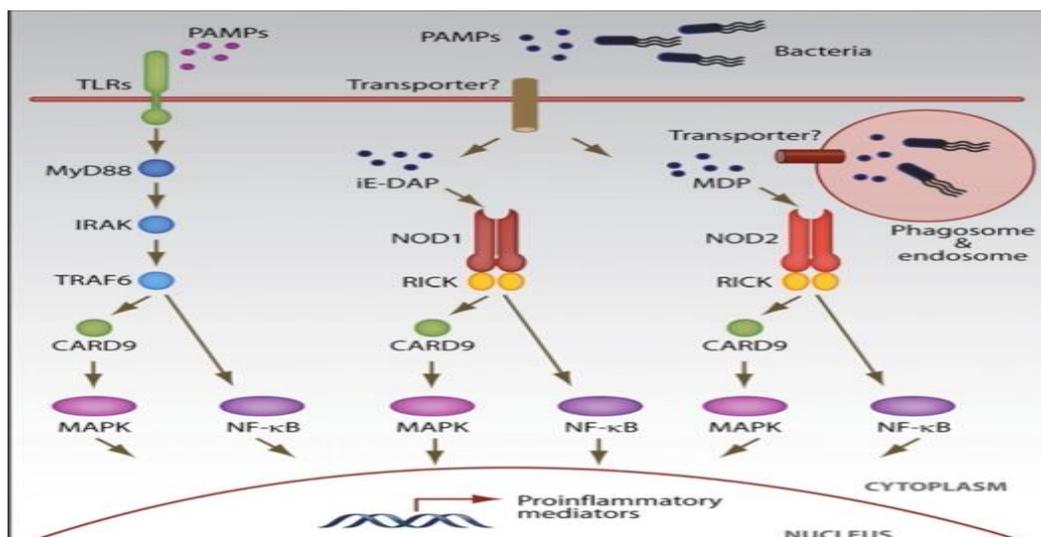


Figure 14: Récepteur NOD et TLR rôle dans l'activation cellulaire par la voie NFκB et synergisent l'apoptose cellulaire par la voie des caspases [23]

Par ailleurs, des cellules spécialisées localisées à la base des cryptes de Lieberkühn dans l'intestin grêle, les cellules de Paneth, secrètent des peptides antimicrobiens dont les alphas défensines qui sont diminuées dans la MC (ce qui n'est pas le cas des autres peptides anti-infectieux secrétés par ces cellules). Cette diminution semble liée à celle de NOD2 (par perte de fonction, conséquence des mutations) et aboutit notamment à une plus faible capacité à détruire *E. coli* et *S. cerevisiae* (phénomènes observés *in vitro*). Le déficit en alphas défensine semble donc un mécanisme important dans la physiopathologie de la MC [24].

De nombreuses études épidémiologiques ont démontré la grande variation ethnique de la contribution du gène NOD2/CARD15 à la maladie de Crohn, cette contribution étant définie par la fréquence des trois mutations décrites dans ce gène.

Le risque absolu de développer une maladie de Crohn chez les porteurs d'une des trois mutations est estimé à l'état homozygote à 1/25 démontrant ainsi le rôle probable d'autres facteurs environnementaux et/ou génétiques. Une méta-analyse a

montré que les conséquences de chacune de ces trois mutations étaient différentes. Le risque relatif de développer une maladie de Crohn chez un patient porteur d'un allèle mutant était augmenté de 4, 3 et 2 pour respectivement Leu1007fsinsC, G908R et R702W [25]. Ce risque est multiplié par 20–40 chez les homozygotes ou hétérozygotes composites. Une mutation est retrouvée chez environ 15–20% des patients atteints de maladie de Crohn [26].

L'association entre la présence de mutations NOD2 et la MC a été établie par de nombreuses études dans des populations différentes, avec des variations géographiques et démographiques importantes concernant la fréquence des mutations du gène NOD2/CARD15 chez les patients porteurs de la MC.

L'étude européenne multicentrique avait rapporté une fréquence de la mutation NOD 2 chez les patients porteurs de la maladie de crohn de 50 %[27]. Des résultats similaires dans l'europe centrale avaient été publiés. En France, la mutation NOD2/CARD15 a été recherchée chez 205 patients crohniens, et chez 95 contrôles, elle était de 38% chez le premier groupe Vs 20% chez les contrôles ($p < 0,002$). Dans cette étude, on a constaté que la variante p.Arg702Trp était la plus corrélée à la maladie [28]. En Allemagne, la fréquence de la mutation NOD2/CARD15 avoisinait celle du reste de la population de l'Europe centrale, elle était de 35,6% dans une cohorte de 180 patients crohniens comparée à 15,5% chez les patients contrôles ($p = 0.0001$) [29]. En Belgique, la fréquence de la mutation était également élevée, elle était de l'ordre de 46,3% dans une étude ayant inclu 570 patients atteints de MC comparée à 20,6% chez le groupe contrôle ($p < 0,0001$) [30]. En fin en Italie, une étude incluant 316 patients crohniens avait retrouvé une fréquence de la mutation NOD2/CARD15 de 38,2% comparée à une fréquence de 15,1% chez le groupe contrôle ($p < 0,0001$), la fréquence allélique était de l'ordre de 9,3% pour la

variante p.Leu1007fsinsC Vs 0,7% dans le groupe contrôle ($p < 0,00001$), elle était de 7.3% pour la variante p.Gly908 Arg Vs 2,7% dans le groupe contrôle ($p < 0,002$) et de 8,7% pour la variante p.Arg702Trp Vs 4,1% pour le groupe contrôle ($p < 0,006$)[31]

Ainsi, en grande Bretagne, une étude réalisée à l'université d'Oxford ayant inclu 244 patients atteints de MC avait retrouvé une fréquence de 38,5% (N=94), la fréquence allélique de la variante p.Leu1007fsinsC était de 9,4% Vs 1.6% chez les patients contrôles ($p < 0,0001$), elle était de 3,3% chez les patients crohniens pour la variante p.Gly908 Arg Vs 1,4% chez le groupe contrôle ($p = 0,03$), et de 12,5% pour la variante p.Arg702Trp Vs 5,2% chez le groupe contrôle ($p < 0,0001$) [32].

Par contre, dans les pays scandinaves, caractérisés en général par une population homogène, les fréquences observées était beaucoup plus basses[33]: Dans une étude réalisée en Finland, incluant 198 patients atteints de MC et 300 sujets contrôles, la fréquence de la mutation NOD2/CARD15 n'était que de 15.5%, mais elle gardait toujours une différence significative par rapport au groupe contrôle (6.7%. $p < 0.001$)[34]. En Suède, la fréquence de cette mutation était également de 15.2%, parmi 178 patients crohniens inclus, Vs 4.2% chez le groupe contrôle ($p = 0.001$). la fréquence allélique chez les sujets atteints de la MC était de 2% pour la variante p.Gly908 Arg et de 4.5% pour la variante p.Arg702Trp, Vs 0% et 0.7% dans le groupe contrôle ($p = 0.045$, $p = 0.008$ respectivement), pour la variante p.Leu1007fsinsC, il n'y avait pas de différence significative entre les malades et les contrôles (2% Vs 1.7%) [35]. En Danemark, une étude ayant inclu 388 patients atteints de MC, et 796 contrôles, avait retrouvé une fréquence de la mutation de 21% Vs 10% dans le groupe contrôle ($p < 0.001$)[36].

Ainsi, ces trois mutations représentent une susceptibilité accrue pour la maladie de Crohn avec une prévalence plus faible dans les pays du nord de l'Europe [17].

Aux états unis, la fréquence de la mutation du gène NOD2 variait entre 36.5 et 45% dans deux études ayant inclu respectivement 201 et 186 patients crohniens [37–38]. Au Canada, cette fréquence était également élevée, estimée à 32.5% dans une cohorte ayant inclu 507 patients crohniens Vs 20% dans le groupe contrôle, et à 45% dans une deuxième étude ayant inclu 231 patients atteints de MC [39–40]

En Asie, notamment au Japon, en Corée et en Chine, dans les populations afro-américaines, CARD15 ne semble pas jouer un rôle dans le développement de la maladie de Crohn contrairement à la population européenne où une grande hétérogénéité existe entre les différents pays .en effet aucune de ces variantes du gène NOD2 n'a été retrouvée dans les populations asiatiques: dont une étude japonaise incluant 350 patients atteints de MC [41], deux études chinoises ayant inclu 65 et 61 patients crohniens [42–43], et une étude indienne ayant inclu 82 patients [44]. Sachant que la caractéristique supplémentaire de ces populations c'est qu'elles soient relativement beaucoup plus homogènes.

Dans une étude réalisée en Iran , ayant inclu 90 patients atteints de MC, la prévalence de la mutation était de 13,3%, avec une différence significative par rapport aux contrôles ($p < 0.001$) [45]. Ceci laisseraient supposer que ces mutations pourraient également exister dans la population asiatique.

Dans les pays d'origine arabe comme la Jordani, une étude ayant inclus 51 patients porteurs de la MC, cette étude a montré une fréquence légèrement plus élevée de la mutation du p.Gly908 Arg chez les patients atteints de MC par rapport aux témoins, bien qu'elle ne soit pas statistiquement significative (5,9 % contre 1,9

% ; P 0,32). Les deux autres mutations étudiées (G908R 1007fs) n'ont pas été détectées dans les patients ou les contrôles[46]. Egalement en Turquie, une étude portant sur 56 patients atteints de la MC, avait retrouvé une fréquence très basse de la mutation NOD2 (10.7%), mais avec une différence significative par rapport au groupe contrôle (1.5%, OR=7.9). dans cette étude la seule variante retrouvée était p.Gly908 Arg [47]. De même pour la Tunisie, dans une étude ayant intéressé 130 patients crohiens et 90 contrôles, la fréquence de la mutation était tellement basse qu'il n'y avait pas de différence significative avec le groupe contrôle [48].

En ce qui concerne la population marocaine, il existe peu de données sur la prévalence de cette susceptibilité génétique. Une seule étude déjà réalisée dans l'unité de génétique médicale du centre hospitalier universitaire (CHU) Ibn Sina portée sur 101 patients atteints de la maladie de Crohn et 107 témoins sains a montré que ces trois principales variantes du gène NOD2 étaient présentes chez les patients sans différence significative par rapport aux témoins [9]. La fréquence allélique de la variante p.Gly908 Arg était de 6.49%, pour la variante p.Leu1007fsinsC, cette fréquence était de de 0.99%, et pour la variante p.Arg702Trp, elle était de 0.49%, sans différence significative avec le groupe contrôle. Dans notre série, nous avons identifié la présence des variantes p.Arg702Trp et p.Gly908 Arg avec une fréquence estimée à 1,7 % pour chacune des deux variantes. La variante p.Leu1007fsinsC n'a pas été identifiée.

En se basant sur ces données, il paraît que l'origine ethnique des patients intervient dans la prévalence de ces mutations. La population arabe fait partie des populations chez lesquelles cette prévalence est très faible.

Ainsi Parmi les trois variantes, celle du p.Gly908Arg est la moins fréquente dans la population caucasienne [6–30–14], et la principale variante chez les tunisiens [46] et dans la série marocaine (I.Hama Et al.)[9]. Dans notre série, aucune association significative n'a été retrouvée pour le polymorphisme p.Gly908Arg, et p.Arg702Trp située sur l'exon 4 était présente que chez 2 patients chacune. La variante p.Leu1007fsinsC située sur l'exon 11, qui semble augmenter le risque de maladie de crohn dans la population caucasienne, était absente chez tous nos patients, elle était présente chez deux patients dans la série marocaine étudiée par I.Hama et al.[9]

Par ailleurs, l'alignement des séquences des exons 4, 8 et 11 a montré la présence d'un polymorphisme c.2753C–A (p.Ala918Asp) au niveau de l'exon 8 chez 2 patients, d'un polymorphisme c2030–C (Leufs100) au niveau de l'exon 11 chez deux patients et d'un polymorphisme c. 2105G–C (p.Gly702Asp) au niveau 4 chez deux patients. En effet, ce dernier polymorphisme n'a été rapporté chez aucune population, à part la série marocaine de I.Hama et al [9], mais sans association significative avec la maladie de crohn, suggérant une particularité peut être de la population nord–africaine, avec la présence de nouveaux gènes de prédisposition, chose qui reste à confirmer sur une série national voire maghrébine. (Tableau 3

Tableau 3 : La fréquence des trois variations de gène NOD2 /CARD 15 (R702W, G908R, 1007fs) dans les différentes populations selon la littérature.

Population		Nombre de patients		Fréquence de la mutation NOD2/CARD15		R702W		G908R		1007fs	
		MC	C	MC	C	MC	C	MC	C	MC	C
Europe centrale	France [28]	20	95	38	20	11,	4,7	3,7	1,6	9	4,2
	Allemagne [29]	18	97	35,6	15,	7,2	3,6	4,2	2,1	12,2	2,1
	Belgique [30]	57	16	46,3	29,	12,	5,8	6	1,8	8,6	3
	Italie [31]	31	20	38,2	15,	8,7	4,1	7,3	2,7	9,3	0,7
Grande Bretagne [32]		22		38,5		12,	5,2	3,3	1,4	9,4	1,6
Pays	Finlande [34]	19	30	15,5	6,7	3,3	1,8	0,6	0,0	4,8	1,7
	Suède[35]	17		15,2	4,2	2	0,0	4	0,7	2	1,7
	Danemark[36]	38	79	21	10	0,0	1,5	2,6	1,0	16,4	2,1
Asie	Japon [41]	35	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-
	Chine [43]	65	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-
	Inde[44]	82	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-
	Iran [45]	90	12	13,3	-	1,3	-	2,2	-	1,7	-
	Jordanie [46]	51	5,9	1,9	5,9	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Turquie [47]	56	-	10,7	1,5	-	-	-	-	-	-
Canada [40]		23	71	45	9	12,	4,2	5,2	0,7	10,3	0,7
Afrique du Nord	Tunisie [48]	13	90	-	-	0,0	0,00	0,05	0,03	0,01	0,00
	Maroc(Rabat)	10	10	13,7	6,5	6,4	2,8	0,99	0,0	0,49	0,46
	Maroc(Fès)	17	-	2,31	-	1,2	-	1,2	-	0,0	-

La valeur diagnostique du génotypage de NOD2 ne permet pas aujourd'hui de remettre en question les outils diagnostiques classiques que sont la clinique, l'endoscopie, l'histologie, la biologie et la radiologie. Il n'est donc pas utile en pratique courante de génotyper les sujets à risque de MC pour le gène NOD2.

On peut ensuite se poser la question de l'impact des mutations sur la présentation clinique de la maladie et donc de l'intérêt d'un génotypage non plus chez les apparentés sains mais chez les malades. Les études de corrélation

génotype/phénotype ont permis de montrer que les sujets porteurs de mutations de NOD2, en particulier les sujets doublement mutés, avaient certaines caractéristiques. L'âge de début de la maladie apparaît plus précoce. Cette différence, de 3 à 4 ans en moyenne, n'a cependant que peu d'impact sur la prise en charge clinique.

Les sujets porteurs de mutations ont enfin été rapportés comme ayant plus souvent des complications évolutives avec des sténoses et/ou des fistules.[49–50] Cette information, certes importante, est cependant difficile à utiliser en pratique courante en l'absence de traitement préventif de ces complications. Une surveillance attentive des patients est donc certainement préférable à un typage de NOD2.

Enfin, il est légitime de se demander si le génotypage de NOD2 peut être utile à la décision thérapeutique. Deux groupes ont étudié la réponse et la toxicité des anti-TNF (Infliximab) selon le génotype de CARD15 des patients. Les deux études concluent négativement. Il ne semble pas non plus y avoir de rôle de Nod2 dans la réponse aux autres traitements. [51] Pour les autres gènes de susceptibilité aux MICI, il n'a pas été montré d'association suffisamment forte et reproductible entre les gènes identifiés et des paramètres cliniques utiles. Le génotypage des gènes de susceptibilité aux MICI n'est donc pas recommandé aujourd'hui dans le cadre du suivi de la maladie tout comme dans le cas du dépistage des apparentés. Plus récemment, des gènes modulateurs du phénotype qui ne participent pas au risque de maladie mais à l'expression clinique de celle-ci ont été identifiés. Ces gènes ont toutefois des effets faibles et ne sont pas d'utilité en pratique clinique.[52]

CONCLUSION

Notre série se caractérise par une fréquence très faible des variantes R702W, G908R (1,4%) et l'absence de la variante 1007fs du gène NOD2, avec une prédominance de la localisation colique et de la forme luminale de la maladie. Il serait intéressant, pour mieux évaluer l'implication des mutations du gène NOD2 dans la population marocaine, de rechercher l'ensemble des mutations décrites sur ce gène, et d'élargir l'étude sur un nombre plus important de patients afin de pouvoir étudier des corrélations génotype-phénotype.

RESUME

INTRODUCTION : Les maladies inflammatoires Chroniques de l'intestin(MICI), en pratique la maladie de Crohn(MC) et la rectocolite hémorragique(RCH), décrites dans la première partie du XX siècle, sont devenues un problème de santé publique où le risque cumulé durant la vie d'avoir une MICI est de 0,5 à 1%. Elles se caractérisent par une atteinte inflammatoire chronique et récidivante de la paroi intestinale chez des sujets souvent jeunes. L'hypothèse étiologique actuelle est celle des maladies multifactorielles complexes, survenant chez des individus génétiquement prédisposés, au cours desquelles une réponse immunitaire muqueuse anormale vis-à-vis de la microflore intestinale survient, déclenchée ou aggravée par des facteurs environnementaux. La fréquence des formes familiales de MICI ainsi que la concordance chez les jumeaux homozygotes illustrent par ailleurs l'importance du terrain génétique.

L'objectif était de déterminer la prévalence des mutations du gène NOD2/CARD15 et ses variantes R702W, G908R, 1007Fs chez des patients Marocains atteint de Maladie de Crohn et d'étudier sa corrélation génotype-expression phénotypique.

MATERIELS ET METHODES : Il s'agit d'une étude prospective qui a été commencée en janvier 2011 en collaboration avec l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU HASSAN II de Fès. Le groupe d'étude de ce travail s'est réuni à plusieurs reprises pour l'élaboration du protocole d'étude, la réalisation et la validation du CRF (case report form) et de la charte de l'étude.

Dans cette étude nous avons inclus tous les patients âgés de plus de 16 ans, suivis au service d'hépatogastroentérologie du CHU HASSAN II de FES pour maladie de crohn, quel que soit le profil clinique, le stade évolutif et la localisation de la maladie, ainsi que les patients nouvellement diagnostiqués. Cent soixante-treize

patients éligibles avaient bénéficié d'un prélèvement sanguin après avoir reçu des explications sur les procédures et les objectifs de l'étude. Nous avons analysé les caractéristiques épidémiologiques, cliniques, endoscopiques, thérapeutiques et évolutives des patients

RESULTATS : Cent soixante-treize patients atteints de la maladie de Crohn ont été inclus dans l'étude, L'âge moyen était de 34.9ans [17-74 ans]. Le sexe ratio F/H était de 1.54. Soixante-dix-neuf pour cent des patients provenaient d'un milieu urbain. Un antécédent de tabagisme était retrouvé chez 12 % des cas, et une MICI familiale chez 5% des cas. La maladie était révélée par des diarrhées chroniques chez 109 patients (63%), par des douleurs abdominales chez 67 patients(39%) dont 48 cas sous forme de syndrome de Koenig (28%), elle était diagnostiquée devant un syndrome dysentérique chez 48 patients (28%), devant des manifestations ano-périnéales dans 32 cas (19%) et devant des signes digestifs hauts à type de vomissement dans 15 cas. Vingt-cinq (14%) patients avaient une poussée minime, 46% des patients avaient une poussée modérée, tandis 27% des patients avaient une poussée sévère. Une colite aigue grave était le mode de révélation de la maladie chez 6 patients. Cinquante-cinq patients (32%) avaient des manifestations articulaires associées, huit patients (5%) avaient des manifestations cutanées et neuf patients (5%) avaient des manifestations ophtalmologiques. Soixante-quatre patients (37%) avaient une localisation iléo colique, et 55 patients avaient une localisation colique isolée (32%) et la localisation gastrique de la maladie était notée chez 2 cas. La maladie était luminale chez 110 patients (64%), sténosante chez 69 patients (40%), fistulisante chez 46 patients (27 %) et ano-périnéale chez 34 cas (20%). Trente-six pour cent des patients avaient recours à la chirurgie (N=63), 60% étaient sous immuno supresseurs (N=103), et 15 % étaient sous anti TNF (N=26).

L'étude génétique a mis en évidence la présence de la variante R702W chez 2 patients, de la variante G908R également chez 2 patients. Soit une fréquence de 1.2% pour chacune. La variante 1007Fs était absente dans notre série. Par ailleurs, l'alignement des séquences des exons 4, 8 et 11 a montré la présence de 3 types de polymorphismes (c.2753C-A, c. 2105G-C, c.3020ins-C) chez six patients.

CONCLUSION : La fréquence des variantes R702W et G908R du gène NOD2/CARD 15 chez les patients porteurs de la maladie de crohn était très faible dans notre série, alors que la variante 1007Fs était absente ouvrant la porte sur plusieurs hypothèses concernant les caractéristiques des MICI dans le contexte Nord Africain et Arabe.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004; 126 (6): 1504–17.
- 2- Khor B et al. Genetics and pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Nature* 2011; 474: 307–17
- 3- Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1989 Dec;34(12): 1841–54.
- 4- Andersson RE et al. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2001 Mar 15; 344(11): 808–14. PubMed | Google Scholar
- 5- Orholm M et al. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 1991 Jan 10; 324(2): 848.
- 6- Hugot JP, Laurent-Puig P et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature*. 1996; 379 (6568): 821–3
- 7- Lesage S et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002;70:845–57
- 8- Adler, J et al, P.D., 2011. The prognostic power of the NOD2 genotype for complicated Crohn's disease: a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol*. 106, 699–712.
- 9- I. Hama. I. Ratbi, et al. Non-association of Crohn's disease with NOD2 gene variants in Moroccan patients. *Gene* 499 (2012) 121–123.
- 10 Neurath et al. *Nat Rev Immunol* 2014
- 11- 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 Jul; 29(7): 990-996.
- 12 - Sendid B, Quintom JF, Charrier G, Goulet O, Cortot A, Grandbastien B, Poulain D, Colombel JF. Anti *saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies in familial Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 1998; 93 (8): 1306–10.
- 13- Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, Mascheretti S, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG. The contribution

- of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002; 122(4): 86774
- 14 –HAMPE, J., S.H. SHAW, R. SAIZ, et al. 1999. Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p. *Am. J. Hum. Genet.* 65: 1647–1655
- 15 –Brant SR, Fu Y, Fields CT, Baltazar R, Ravenhill G, Pickles MR, et al. American families with Crohn's disease have strong evidence for linkage to chromosome 16 but not chromosome 12. *Gastroenterology* 1998;115:1056–61.
- 16 –Cavanaugh J. International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set: crohn disease and chromosome 16. *Am J Hum Genet* 2001;68:1165–71.
- 17 –Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599–603.
- 18 –Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603– 6.
- 19 –Lamoril J, Deybach JC, Bouizegarène P. Maladie de Crohn et génétique: connaissances actuelles. *Immuno-Analyse et Biologie Spécialisée*. 2007; 22(3): 137–150.
- 20 –Cho JH. The Nod2 gene in Crohn's disease: implications for future research into the genetics and immunology of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:271–5.
- 21 –Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* 2006;7:1250–7.
- 22 –Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 2006;442:39–44.
- 23 – Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, Ferguson DJ, Campbell BJ, Jewell D, Simmons A. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med*. 2010;16:90–7.

- 24 –T, Niederreiter L, Adolph T, Blumberg RS, Kaser A. Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut* 2011;60:1580–8.
- 25 –Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol*. 2004 Dec; 99(12): 2393404.
- 26 –Vermeire S. Review article: genetic susceptibility and application of genetic testing in clinical management of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006; 24(Suppl3): 2–10.
- 27 –Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype–phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002;70:845–57.
- 28 –Heresbach D, Gicquel–Douabin V, Birebent B, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms in Crohn's disease: a genotype– phenotype analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 55–62
- 29 –Büning C, Genschel J, Bühner S, et al. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 1073–8
- 30 –Esters N, Pierik M, van Steen K, et al. Transmission of CARD15 (NOD2) variants within families of patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 299–305.
- 31 –Annese V, Lombardi G, Perri F, et al. Variants of CARD15 are associated with an aggressive clinical course of Crohn's disease --an IG–IBD study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 84–92.
- 32 –STOLL, M., B. CORNELIUSSEN, C.M. COSTELLO, et al. 2004. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat. Genet*. 36: 476–480

- 33 –Ernst A, Jacobsen B, Østergaard M, et al. Mutations in CARD15 and smoking confer susceptibility to Crohn's disease in the Danish population. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1445–51
- 34 –Heliö T, Halme L, Lappalainen M, et al. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* 2003; 52: 558–62.
- 35 –Törkvist L, Noble CL, Lördal M, et al. Contribution of CARD15 variants in determining susceptibility to Crohn's disease in Sweden. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 700–5.
- 36 –Ernst A, Jacobsen B, Østergaard M, et al. Mutations in CARD15 and smoking confer susceptibility to Crohn's disease in the Danish population. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1445–51.
- 37 –Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, et al. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 679–88.
- 38 –Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, et al. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 679–88.
- 39 –Newman B, Silverberg MS, Gu X, et al. CARD15 and HLA DRB1 alleles influence susceptibility and disease localization in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 306–15.
- 40 –Vermeire S, Wild G, Kocher K, et al. CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype–phenotype relationship, and haplotype structure. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 74–83
- 41 –Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, et al. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 86–91.
- 42 –Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 1465–70.

- 43 –Li M, Gao X, Guo CC, Wu KC, et al. OCTN and CARD15 gene polymorphism in Chinese patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4923–7.
- 44 –Pugazhendhi S, Amte A, Balamurugan R, et al. Common NOD2 mutations are absent in patients with Crohn's disease in India. *Indian J Gastroenterol* 2008; 27: 201–3.
- 45 –Derakhshan F, Naderi N, Farnood A, et al. Frequency of three common mutations of CARD15/NOD2 gene in Iranian IBD patients. *Indian J Gastroenterol* 2011; 27: 8–11.
- 46 –Jadallah et al.; *BJMMR*, 7(2): 93–105, 2015; Article no.BJMMR.2015.312
- 47 –Uyar FA, Over–Hamzaoglu H, Türe F, et al. Distribution of common CARD15 variants in patients with sporadic Crohn's disease: cases from Turkey. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 706–10.
- 48 –Zouiten–Meki L, Zaouali H, Boubaker J, et al. CARD15/NOD2 in a Tunisian population with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2005; 50:130–5.
- 49 –Cuthbert, A.P., et al., The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2002. 122(4): p. 867–74
- 50 –Fabian Schnitzler, et al. The NOD2 Single Nucleotide Polymorphism rs72796353 (IVS4+10 A>C) Is a Predictor for Perianal Fistulas in Patients with Crohn's Disease in the Absence of Other NOD2 Mutations. Published: July6, 2015.
- 51– Cuthbert, A.P., et al., The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2002. 122(4): p. 867–74
- 52 –Colombel JF. The CARD15 (also known as NOD2) gene in Crohn's disease: Are there implications for current clinical practice? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003; 1: 5–9.