

ROYAUME DU MAROC

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

Faculté de Médecine et de Pharmacie



Prévalence de la mutation NOD2/CARD15 chez les
patients porteurs d'une maladie de Crohn
Résultats de l'étude prospective NOD2 Fès

Mémoire présenté par :

Docteur Lamrani Alaoui Ghita

Née le 02 Juillet 1982 à Fès

Pour l'obtention du diplôme de spécialité en médecine

Option : Hépto-gastro-entérologie

Sous la direction de :

Professeur **MELLOUKI Ihsane**

Session Juin 2015

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma gratitude à la directrice de ce mémoire, Pr Mellouki Ihsane, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion. Un grand merci pour toute l'équipe du service d'Hépatogastroentérologie, pour leur aide précieuse à toutes les étapes de la réalisation de l'étude (recrutement, prélèvement...), ils ont grandement facilité mon travail. Je désire aussi remercier toute l'équipe du service de génétique et biologie moléculaire au CHU Hassan II de Fès, et en sa tête professeur Ouldin, et Dr Bougnouche, qui m'ont fourni les outils nécessaires à la réussite de l'étude universitaire.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers les amis et collègues qui m'ont apporté leur support moral et intellectuel tout au long de ma démarche. Enfin, je tiens à témoigner toute ma gratitude à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

INTRODUCTION :

La maladie de crohn est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MII) à étio-pathogénie complexe. En fait, Les mécanismes moléculaires menant au développement de cette maladie ne sont pas entièrement connus, mais des études génétiques et fonctionnelles ont permis de mettre en évidence des interactions entre des prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux – notamment la flore intestinale – qui contribuent au développement d'une dysrégulation de la réponse immunitaire menant à l'inflammation de la muqueuse intestinale. Des études d'association pangénomiques et ciblées ont permis d'identifier plusieurs gènes de susceptibilité aux MII mais les estimations de la contribution de ces gènes à l'héritabilité suggèrent que plusieurs gènes restent à découvrir. Le premier gène de susceptibilité de la maladie était découvert en 1996 sur le chromosome 16. Ce résultat a été confirmé par des études ultérieures. En 2001, des mutations causales spécifiquement liée à la maladie de crohn ont été identifiées, il s'agit des trois variantes R702W, G908R et L1007fs localisées sur le gène NOD2 également connu sous le nom CARD15.

BUT :

Le but de cette étude est de déterminer la prévalence de la mutation NOD2/CARD15 chez les patients porteurs de la maladie de crohn, en recherchant les 3 variantes R702W, G908R et 1007Fset de déterminer la relation entre les caractéristiques phénotypiques de la maladie et la présence de cette mutation.

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 chargée de la recherche de la mutation, et le laboratoire d'épidémiologie et de recherche clinique du même CHU.

Ont été inclus dans cette étude 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 cinquante 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. Les données étaient recueillies sur une fiche préétablie. Nous avons analysé les caractéristiques épidémiologiques, cliniques, endoscopiques, thérapeutiques et évolutives des patients.

Résultats :

Cent cinquante-trois patients ont été inclus jusqu'au mois d'Avril 2015, dont cent dix-sept patients ont bénéficié d'un séquençage de l'ADN. L'âge moyen était de 34.4 ans [17-74 ans]. Le sexe ratio F/H était de 1.7. 70% des patients provenaient d'un milieu urbain. Un antécédent de tabagisme était retrouvé chez 7.8% des cas, et une MICI familiale chez 6.9% des cas. La maladie était révélée par des diarrhées chroniques chez 82 patients (71.3%), 33 patients (28.7%) avaient une poussée modérée, tandis que 16 patients (15.9%) avaient une poussée sévère. Quarante et un patients (35.6%) avaient des manifestations articulaires associées, et quatre-vingt-cinq patients (74%) avaient une localisation iléo-colique. La maladie était luminale chez 71.3% des cas, sténosante chez 31.3% des cas, fistulisante chez 22.6% des cas et ano-périnéale chez 21.7% des cas. 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 1.7%. La variante 1007Fs était absente dans

notre série. Ces constatations ont été déjà retrouvées lors des résultats préliminaires de ce travail sur 102 patients.

Conclusion :

Notre série se caractérise par un âge jeune avec une prédominance féminine. La maladie se révèle essentiellement par des diarrhées chroniques, elle est luminale dans 71.3% des cas. La fréquence des variantes R702W et G908R était très faible dans notre série, la variante 1007Fs était absente ouvrant la porte sur plusieurs hypothèses concernant les caractéristiques des MICI dans le contexte Nord Africain et Arabe.

PLAN

I. Introduction	7
II. Matériel et méthodes	9
A. Critères d'inclusion	9
B. Déroulement de l'étude	9
C. Analyse statistique	15
III. Résultats	19
A. Données épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques.....	20
B. Résultats de l'étude génétique	24
IV. Discussion	28
V. Conclusion.....	42
VII. Références	43

INTRODUCTION :

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont caractérisées par la présence de lésions inflammatoires, d'étiologies peu connues, pouvant toucher tout ou une partie du tube digestif. La maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) sont les deux principales formes de MICI[1]. La MC a été décrite précisément pour la première fois en 1932 aux Etats-Unis par le docteur Burrill B. Crohn, comme une « iléite terminale ou régionale » à laquelle son nom fut donné [2]. Ces maladies se manifestent par des symptômes cliniques variés et par une évolution chronique avec une succession de poussées plus ou moins intenses, entrecoupées de phases de rémission plus ou moins longues. Les lésions inflammatoires sont secondaires à une activation du système immunitaire muqueux intestinal, due à l'interaction de facteurs génétiques et environnementaux qui commencent à être mieux connus. La MC se différencie de la RCH par sa localisation et l'étendue des lésions, elle constitue un des problèmes majeurs en gastro-entérologie, car elle touche des sujets jeunes. Son évolution chronique se prolonge sur toute la vie du patient et peut atteindre tout le tube digestif[3]. Cette pathologie encore méconnue retentit sur la vie personnelle et professionnelle des malades en raison de la fréquence des poussées et des complications nécessitant souvent un recours à la chirurgie.

Elle affecte de façon prédominante, les sujets de race blanche, essentiellement, les pays les plus riches au monde, à savoir l'Europe et les états unis, avec un taux de prévalence entre 26 et 200/100000 habitants dans les populations européennes [4,5].

L'étiologie exacte de cette maladie n'est pas connue, mais il est clairement établi à partir des premières études épidémiologiques que la susceptibilité

individuelle de développer cette maladie résulte d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux [1,6].

Le caractère familial de la maladie a été considéré depuis 1935, et le premier gène de susceptibilité de la maladie était découvert en 1996 sur le chromosome 16 [7]. Il s'agit du gène NOD2 (Nucleotide Oligomerisation Domain 2) encore appelé CARD15 (Caspase Recruitment Domain 15). Ce résultat a été confirmé par des études ultérieures[8,9]. Ce gène est impliqué dans la réponse immunitaire innée dirigée contre les composantes de la paroi cellulaire bactérienne [5,10,11]. Plus de 60 variations de la séquence du gène NOD2/CARD15 ont été rapportées [12]. 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 [10, 11]. Ces mutations ont été décrites surtout dans la population caucasienne [13, 14].

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 [15].

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.

MATERIEL ET METHODES :

Il s'agit d'une étude prospective entamée en janvier 2011, au service d'hépatogastroentérologie au CHU Hassan II de Fès, étudiant la prévalence de la mutation du gène NOD2/CARD15 chez les patients atteints de maladie de Crohn. Cette étude était réalisée en collaboration avec l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU HASSAN II de Fès chargée de la recherche de la mutation, et le laboratoire d'épidémiologie et de recherche clinique du même CHU.

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, quel que soit le stade évolutif et la localisation de la maladie, ainsi que les patients nouvellement diagnostiqués.
- Le diagnostic de la maladie de Crohn était basé 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 les patients hospitalisés dans le service d'hépatogastroentérologie.

B- Le déroulement de l'étude :

Depuis le 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).

موافقة مريض بعد التوعية من اجل الدراسة في الجينات

لمرض Crohn

الاسم الشخصي.....

الاسم العائلي.....

اقرار المريض

اقرأنا الموقع أدناه..... موافقتي الإرادية على المشاركة من اجل دراسة الجينات لمرض crohn

حرر في: بتاريخ.....

التوقيع:

اقرار الطبيب

اقرأنا الطبيب..... أنني شرحت بالقدر الوافي للمريض طبيعة هذه الدراسة والهدف منها وانه وافق بمحض

إرادته.

حرر في: بتاريخ.....

التوقيع:

Figure1 : fiche de consentement

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 DNAtèque 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 DO_{260} / DO_{280} 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 réplication 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 :

➤ 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.

➤ Reaction de sequence 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.

➤ 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)

IDENTIFICATION DU SUJET

DATE DE DECOUVERTE DE LA MALADIE :

DATE D'INCLUSION |__|__| |__|__|
|__|__|

ANTECEDENTS MEDICO-CHIRURGICAUX

Non Oui

NUMERO D'ORDRE :

1. tabagisme

NOM DU SUJET :

2. Notion de consanguinité :

PRENOM DU SUJET :

DATE DE NAISSANCE |__|__| |__|__|
|__|__|

4. ATCD de maladie inflammatoire
intestinale familiale.

AGE |__|__| ans

Masculin

Si oui, lien de parenté :

SEXE

Féminin

Premier degré : père mère frère sœurs
enfant

AGE DE DECOUVERTE DE LA MALADIE :

|__| ans

ORIGINE :.....
.....

Deuxième degré : oncle
tante neveux cousin

ADRESSE :.....
.....

Siège de l'attente du parent :

MILIEU : U

iléalecolique ileo colique

R

MAP duodénum

TEL5. ATCD de maladie articulaire
familiale. Oui non

Si oui, lien de parenté.....
.....

5. autres antécédents :

CLINIQUE

1. Symptômes révélateurs :
 - a. Douleurs abdominales
 - b. Diarrhées chroniques
 - c. Rectorragies
 - d. Anémie
 - e. Dysenterie
 - f. Atteinte ano périnéale
 - g. Vomissements
 - h. Syndrome anémique
 - i. Fièvre
 - j. Koenig
2. poussée minime
3. Poussée modérée
4. Poussée sévère
5. Colite aigue grave
6. Manifestations extradigestives :
 - Articulaires
 - Cutanées
 - Ophtalmologiques

LOCALISATION DE LA MALADIE

- 1- grêle.
- 2- Colon.
- 3- Anale.
- 4- Œsogastroduodénale.
 - a. Gastrique
 - b. duodénale
- 5- Carrefour iléo-cæcal.
- 6- Autres :.....
.....

FORME DE LA MALADIE

- 1- Luminale
- 2- Sténosante
- 3- Fistulissante
- 4- anopérinéale

PROFIL EVOLUTIF

2. Nombre de poussées par an :
3. Forme cortico dépendante
4. Forme cortico résistance
5. Forme chronique active
6. Maladie en rémission, sous :

- a. 5 ASA
- b. Salasopyrine
- c. Corticoïdes
- d. Immurel
- e. Purinéthol
- f. Metotrexate
- g. Rémicade
- h. chirurgie

Nous avons analysé les caractéristiques épidémiologiques, cliniques, endoscopiques, thérapeutiques et évolutives des patients.

RESULTATS

Jusqu'au mois d'Avril 2015, 152 patients étaient inclus, dont 117 avaient bénéficié d'un séquençage de l'ADN. Nous présentons les résultats chez les patients séquencés.

A. Données épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques:

L'âge moyen était de 34.4ans [17-74 ans]. Le sexe ratio F/H était de 1.74. 78.3% des patients provenaient d'un milieu urbain. Un antécédent de tabagisme était retrouvé chez 7.8% des cas, et une MICI familiale chez 6.9% des cas. La maladie était révélée par des diarrhées chroniques chez 82 patients (71,3%), par des douleurs abdominales chez 61 patients(53%) dont 30 cas sous forme de syndrome de Koenig, elle était diagnostiquée devant un syndrome dysentérique chez 35 patients (30.4%), devant des manifestations ano périnéales dans 23 cas (20%) et devant des signes digestifs hauts à type de vomissement dans douze cas (Figure 3). Quatorze (12%) patients avaient une poussée minime, 33 patients (28.7%) avaient une poussée modérée, tandis que 16 patients (15.9%) avaient une poussée sévère. Une colite aigue grave était le mode de révélation de la maladie chez 5 patients (Figure 4). Quarante et un patients (35.6%) avaient des manifestations articulaires associées, 6 patients (5.2%) avaient des manifestations cutanées et 8 patients (6.9%) avaient des manifestations ophtalmologiques (Figure 5). 85 patients (74%) avaient une localisation iléo colique, et 25 patients avaient une localisation colique isolée (21.7%), une localisation gastrique de la maladie était notée chez 2 cas (Figure 6). La maladie était luminale seule chez 54 patients (47%), sténosante chez 36 patients (31.3%), fistulisante chez 26 patients (22.6%) et ano-périnéale chez 25 cas (21.7%) (Figure 7). 27.8% des patients avaient recours à la chirurgie (N=32), 54% étaient sous immuno supresseurs (N=62), et 8.7% étaient sous anti TNF (N=10).

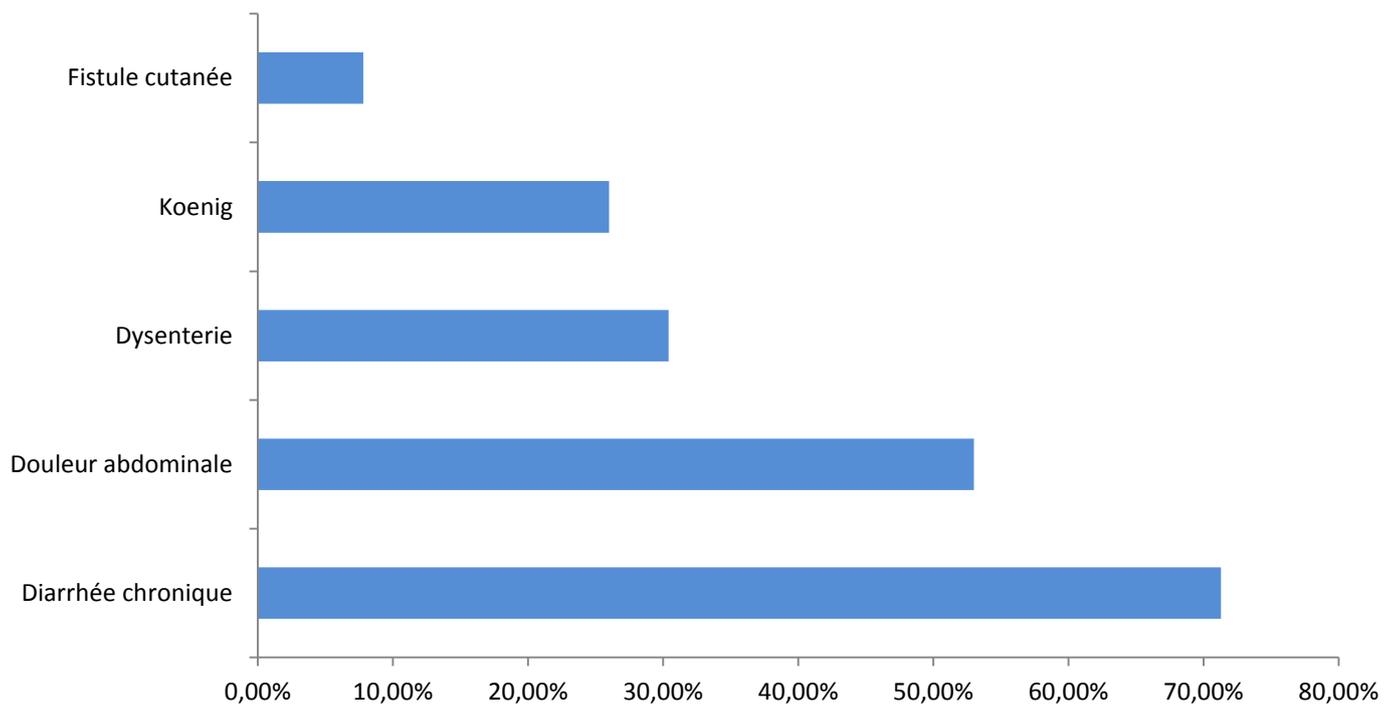


Figure 3 : Circonstances de découvertes

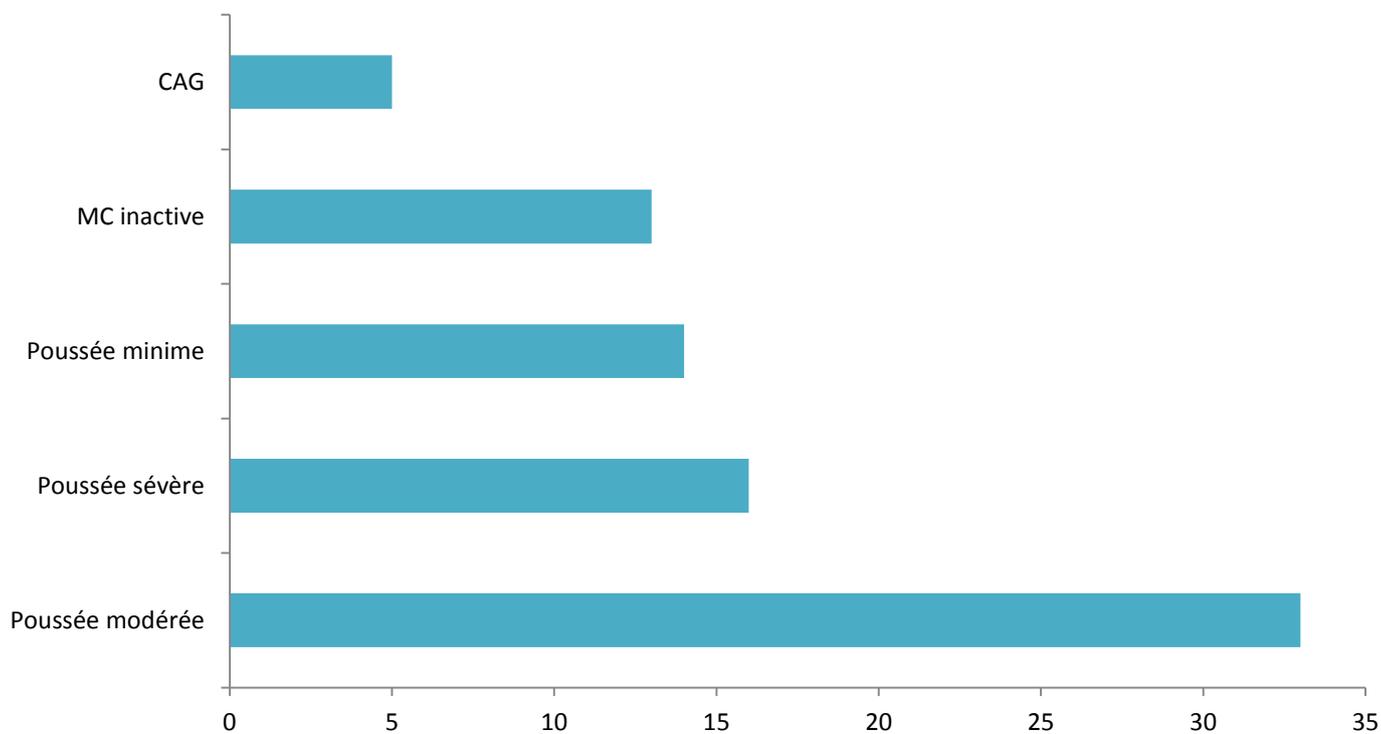


Figure 4 : Activité de la Maladie de crohn

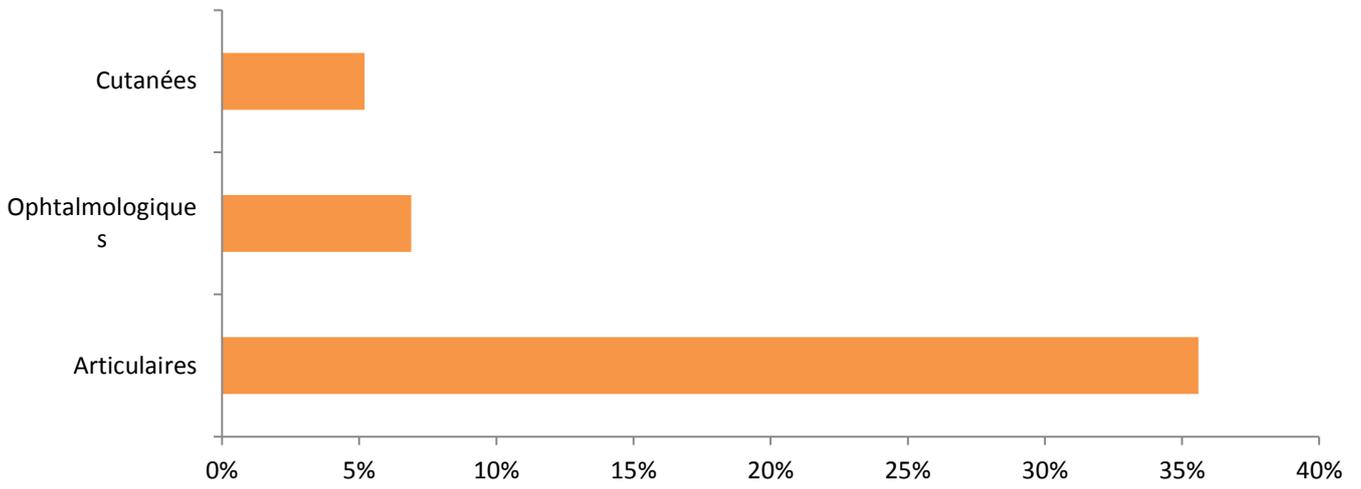


Figure 5 : Manifestations extradiigestives

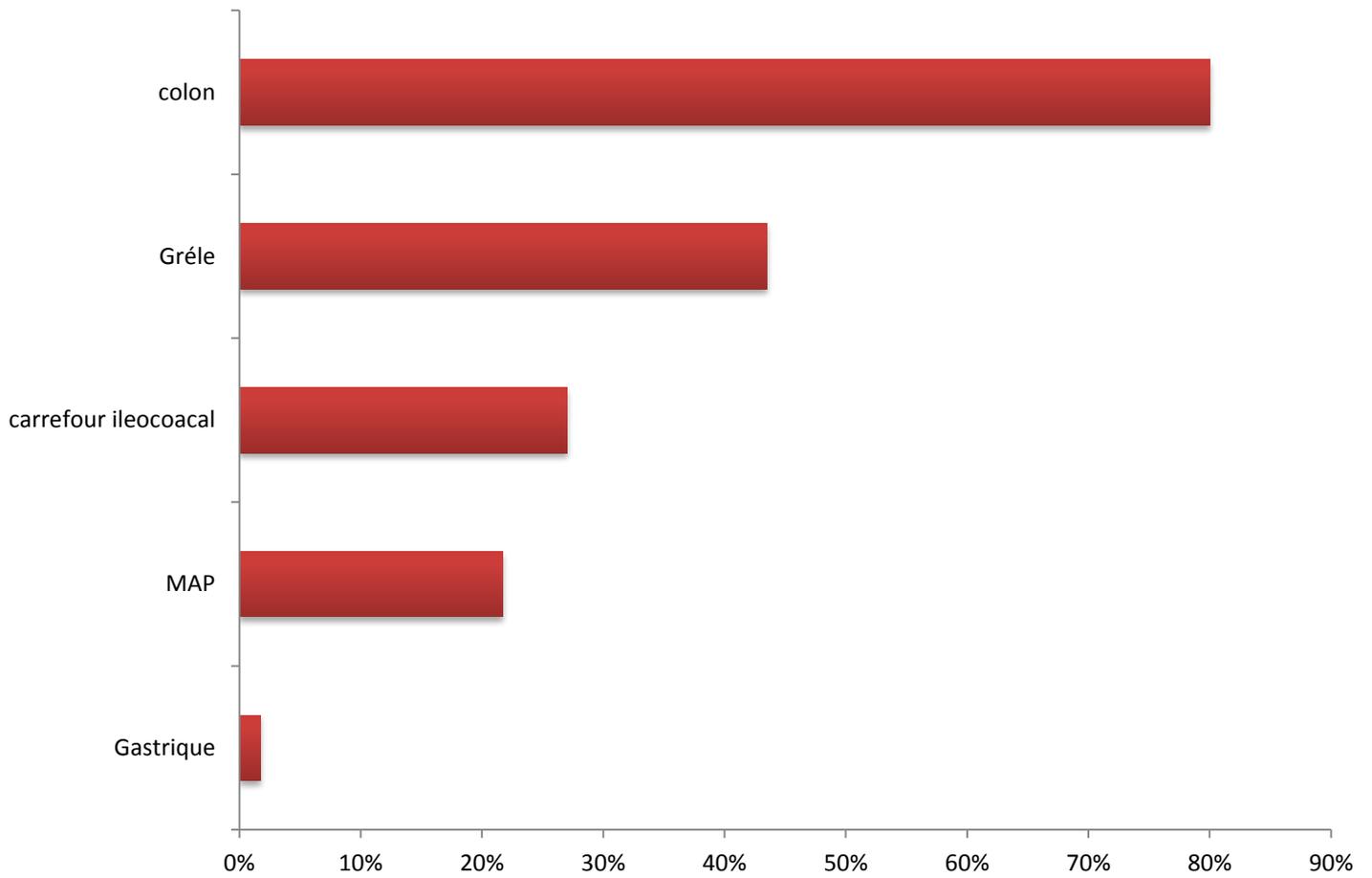


Figure 6 : Localisation de la maladie

Forme de la maladie	Nombre de patients
luminale seule	54
Luminale et sténosante	4
Luminale et fistulissante	3
Luminale et ano périnéale	14
Sténosante seule	11
Sténosante et fistulissante	12
Sténosante et ano périnéale	1
Fistulissante seule	5
Anopérinéale seule	2
Luminale, sténosante et anopérinéale	5

Figure 7 : Formes de la maladie de crohn

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).

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) et d'un polymorphisme c. 2105G-C (p.Gly702Asp) niveau de l'exon 4 chez un patient.

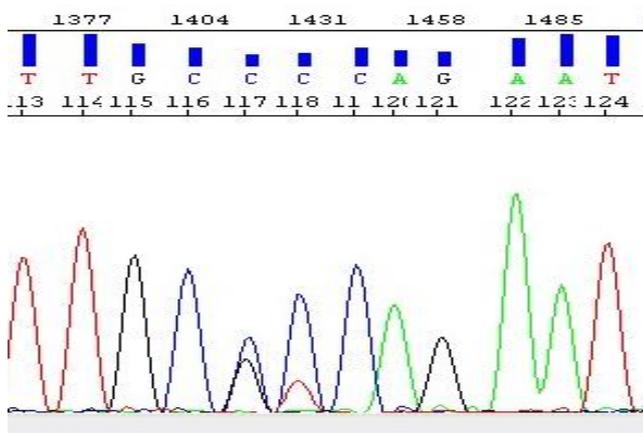


Figure 8:
p.Gly908Arg
c. 2722G-C
exon 8
(2 patient MC)

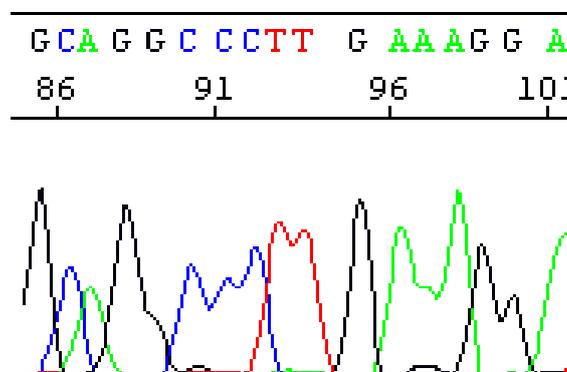


Figure 9:
p.Leu1007fsinsC
c.3020insC
Exon 11
(0 patient MC)

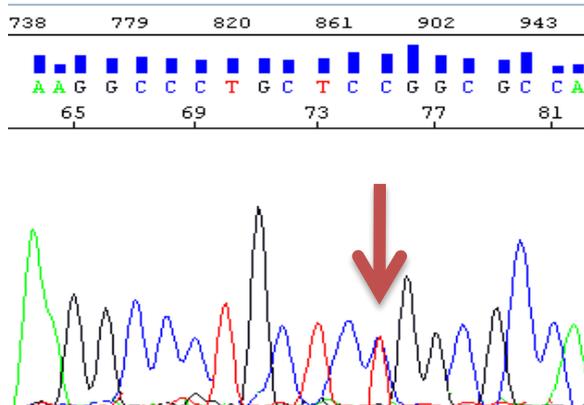


Figure 10:
p.Arg702Trp
c.2104C-T
Exon 4
(2 patient MC)

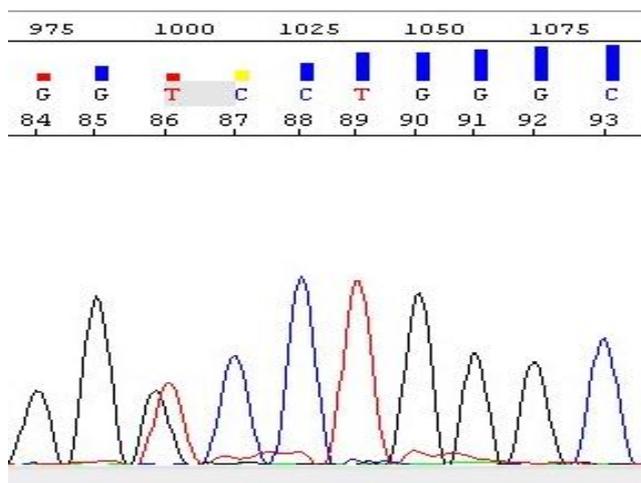


Figure 11:
polymorpisme
c.2753C-A
Exon 8
(2 patient MC)

Tableau 1 : Caractéristiques phénotypiques chez les patients avec présence de la variante R702W au niveau de l'exon 4

	Patient 1	Patient 2
Age de découverte	53	29
Sexe	F	F
ATCD familiaux de MICI	Non	Non
Circonstances de découverte	Bilan de SPA	Abcès appendiculaire
Manifestations extradigestives	Oui	Non
Localisation de la maladie	Atteinte colique luminale	Carrefour iléocaecale
Activité de la maladie	Maladie inactive	Maladie en rémission après chirurgie

Tableau 2 : Caractéristiques phénotypiques chez les patients avec présence de la variante G908R au niveau de l'exon 8

	Patient 1	Patient 2
Age de découverte	30	24
Sexe	M	F
ATCD familiaux de MICI	Non	Non
Circonstances de découverte	Diarrhée chronique	Diarrhée chronique
Manifestations extradigestives	Non	Non
Localisation de la maladie	Atteinte colique et grêlique luminale	Atteinte colique sténosante avec MAP
Activité de la maladie	Forme chronique active	Forme chronique active

Tableau 3 : Caractéristiques phénotypiques chez les patients avec présence d'un polymorphisme c.2753C-A (p.Ala918Asp) au niveau de l'exon 8

	Patient 1	Patient 2
Age de découverte	32	29
Sexe	F	F
ATCD familiaux de MICI	Non	Non
Circonstances de découverte	Diarrhée chronique	Diarrhée chronique
Manifestations extradigestives	Non	Non
Localisation de la maladie	Atteinte colique et grêlique luminale	Atteinte iléocoecale sténosante + MAP
Activité de la maladie	Forme chronique active	Forme chronique active
Autres	-	Maladie cœliaque associée

Tableau 4 : Caractéristiques phénotypiques chez le patient avec présence d'un polymorphisme c. 2105G-C (p.Gly702Asp) niveau de l'exon 4

	Patient 1	Patient 2
Age de découverte	30	24
Sexe	M	F
ATCD familiaux de MICI	Non	Non
Circonstances de découverte	Diarrhée chronique	Diarrhée chronique
Manifestations extradigestives	Non	Non
Localisation de la maladie	Atteinte colique et grêlique luminale	Atteinte colique sténosante avec MAP
Activité de la maladie	Forme chronique active	Forme chronique active

DISCUSSION

Les mécanismes moléculaires menant au développement des MII ne sont pas entièrement connus, mais des études génétiques et fonctionnelles ont permis de mettre en évidence des interactions entre des prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux – notamment la flore intestinale – qui contribuent au développement d'une dérégulation de la réponse immunitaire menant à l'inflammation de la muqueuse intestinale. Des études d'association pangénomiques et ciblées ont permis d'identifier plusieurs gènes de susceptibilité aux MII mais les estimations de la contribution de ces gènes à l'héritabilité suggèrent que plusieurs gènes restent à découvrir. [16–20].

En fait, dès 1934, la maladie de crohn a été reconnue comme une affection à composante familiale. La proportion des agrégations familiales était en moyenne de 8% à 10%, avec une forte fluctuation entre les études. Ces agrégations soutiennent l'hypothèse d'implication de facteurs génétiques dans la maladie. En plus, la découverte récente de gènes de susceptibilité aux maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) confirme cette hypothèse. Cependant, les facteurs de risque environnementaux partagés par les membres d'une même famille contribuent également à cette agrégation familiale [21].

En 1990, l'analyse de ségrégations de maladies avait suggéré l'existence d'un gène récessif majeur pouvant expliquer la prédisposition à la maladie de crohn. Ce point de vue a été définitivement écarté en se basant sur le résultat d'une douzaine d'études de criblage du génome publiées récemment [12–16, 22], 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. (Figure 12)

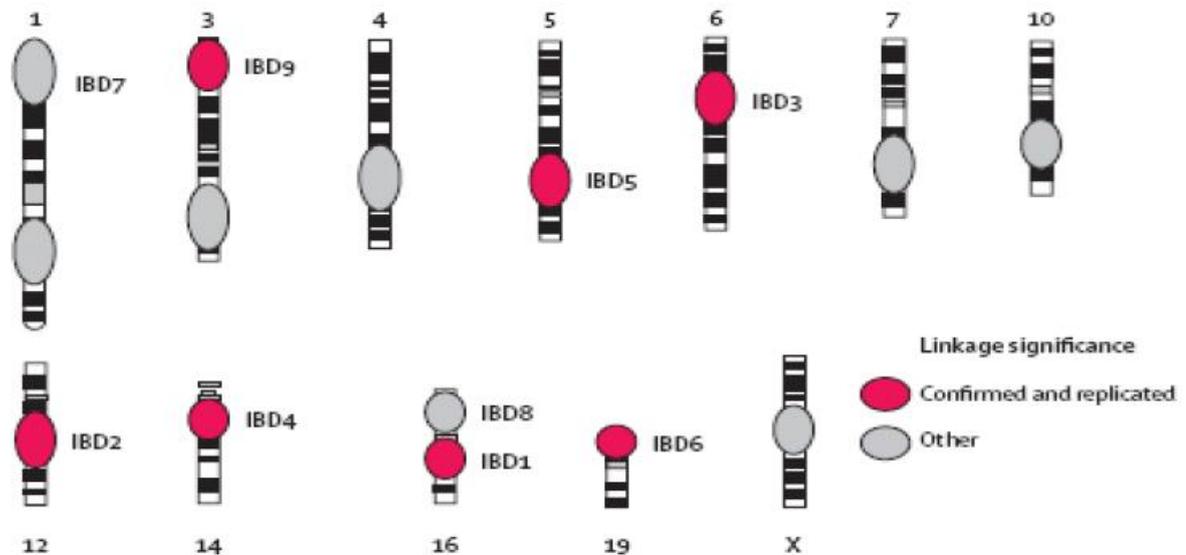


Figure 12 : Gènes de susceptibilité aux MICI identifiés lors de l'analyse du génome humain

➤ Sur le chromosome 5, un groupe canadien avait identifié des gènes de susceptibilité de la maladie de crohn, ces gènes sont SLC22A4 et SLC22A5 codant pour les protéines OCTN1 et 2 (pour organic cationic transportor 1 et 2), impliquées dans le transport de la carnitine et de xénobiotiques. Cependant, on comprend mal leur rôle dans la physiopathologie de la maladie [23].

➤ En même temps, des polymorphismes (DLG5), localisés sur le chromosome 10, ont été rapportés par un groupe allemand comme étant associé à la MC [24]. Ces polymorphismes induisent des variations non conservatrices sur la séquence de la protéine, mais leur effet fonctionnel n'a pas encore été testé.

➤ **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 [10,11], et ensuite validées par de nombreuses études

[12, 25]. D'une manière générale, ces études avaient permis de conclure que NOD2 (nommé plus tard CARD15) était un gène majeur de la MC.

– Le gène NOD2 / CARD15

Le premier gène identifié et le plus étudié à l'heure actuelle est le gène NOD2 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2) aussi appelé CARD15 (Caspase recruitment domain 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 [10, 11].

– Localisation chromosomique et structure Le gène NOD2 est situé en 16q12, dans la région péri-centromérique du chromosome 16 (locus IBD-1) (Figure 8). 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 (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. NOD2 possède la structure caractéristique des protéines NLR : un domaine N-terminal CARD (Caspase Recruitment Domain), un domaine central NACHT ou NOD (Nucleotide-binding and Oligomerization Domain) et un domaine C-terminal riche en leucine LRR (Leucine Rich Repeat) (Figure 13).

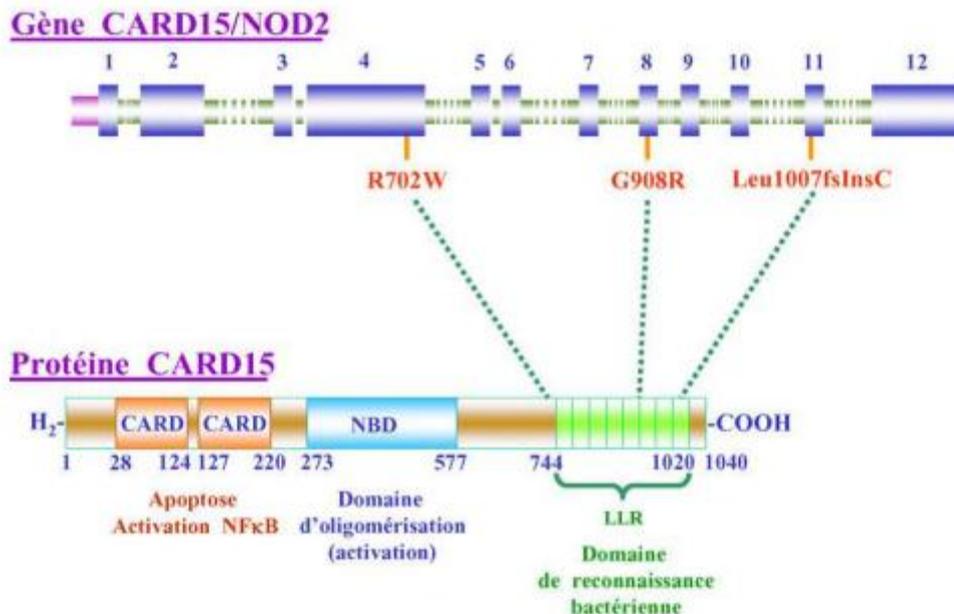


Figure 13 : Structure du gène et de la protéine NOD2/CARD15 (d'après Lamoril, Immunoanalyse et Bio. Spéc., 2007 [26])

CARD15/NOD2 est une protéine de 1044 AA, comportant trois portions fonctionnelles : (Figure 13)

- La partie C terminale de la protéine contient un domaine riche en Leucine, dont le rôle dans les interactions protéine-protéine est connu.
- La partie médiane de la protéine : caractérisée par la protéine NOD, impliquée dans l'auto-oligomérisation.
- En fin, la partie N-terminale de la protéine, contenant deux domaine CARDS connus par leur rôle dans l'apoptose et dans les voies d'activation NF- κ B

La protéine codée par le gène CARD15 est exprimée surtout dans les cellules de la lignée monocyte/macrophage [27,28]. Elle est présente dans le cytoplasme de la cellule et active la voie de signalisation NF- κ B tout comme le récepteur du TNF ou les Toll Like récepteurs (TLR) présents à la surface de la cellule. Plus récemment, Nod2 a été impliqué dans la voie de l'IL1 β en participant à l'inflammasome [29]. Il a

aussi été montré avoir un rôle dans l'autophagie, dans l'activation de l'interleukine 10, de la synthèse des défensines [30]. Nod2 semble donc avoir plusieurs fonctions et la fonction clé associée au développement de la MC reste très débattue malgré une littérature abondante depuis 10 ans.

Plusieurs groupes ont montré que Card15/Nod2 pouvait être activé par le peptidoglycane, un composant de la paroi bactérienne. Le motif minimal du peptidoglycane capable d'activer Nod2 est le muramyl-dipeptide (MDP), un composé chimique connu depuis fort longtemps pour ses propriétés adjuvantes de la réponse immune vaccinale. En présence de MDP, Card15/Nod2 active la voie pro-inflammatoire de NF- κ B [29,31].

L'expression de NOD2 dans l'épithélium intestinal est limitée, elle est surtout le fait des cellules de Paneth présentes dans les cryptes de l'iléon. Ces cellules sont connues depuis environ un siècle, mais leur fonction est restée une énigme jusqu'à ce que l'on réalise qu'elles sont essentielles dans la défense innée de la muqueuse intestinale en tant que régulateurs de la densité microbienne de l'intestin grêle [32]. Elle sécrètent des produits antibactériens tels que le lysozyme ou les défensines et assurent ainsi la stérilité des cryptes. Pour certains auteurs, la MC résulterait alors d'un déficit de cette fonction aboutissant au passage de bactéries dans la muqueuse et à une inflammation réactionnelle [33,34]. Le rôle de NOD2 dans les plaques de Peyer a aussi été établi, suggérant un rôle clé de cette molécule dans la régulation de la fonction immune et de la perméabilité intestinale [35].

Même si les mécanismes exacts qui provoquent les lésions sont mal connus, la découverte de CARD15/NOD2 a eu pour conséquence de recentrer la physiopathologie de la MC sur l'immunité innée.

Lesage et al avaient analysé le spectre mutationnel du gène CARD15. Ils avaient retrouvé au moins 60 polymorphismes génétiques incluant plus de 30

mutations ayant potentiellement un effet biologique [13]. La plupart d'entre elles sont rares (mutations privées). A l'inverse, trois mutations apparaissent fréquentes. Il s'agit des variantes R702W, G908R et 1007fs qui représentent ensemble plus de 80% des chromosomes mutés.

- 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 [36] (Figure 12). Une perturbation de l'immunité innée, via l'augmentation de la sécrétion de cytokines proinflammatoires, comme le TNF ou l'IL-1 β est aussi imputée à la mutation du gène NOD2 [37,38], ainsi qu'un défaut de l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 [39]. De plus, des patients porteurs d'une mutation sur le gène NOD2 montrent une diminution de l'expression des défensines, des peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules de Paneth au niveau de l'iléon qui interviennent dans le maintien de l'homéostasie intestinale [40-42]. Cependant, cette hypothèse est controversée et une étude avance l'hypothèse que la diminution de l'expression des défensines est liée uniquement à l'apoptose des cellules de Paneth causée par l'inflammation intestinale [43]. Enfin, la mutation de NOD2 entraînerait une diminution de l'autophagie, renforçant le défaut de clairance bactérienne [44]. Ce défaut de clairance peut se traduire par une augmentation de la translocation bactérienne vers les ganglions mésentériques. En effet une augmentation de la translocation bactérienne, responsable de péritonite bactérienne, a été associée aux mutations de NOD2 chez des patients [45].

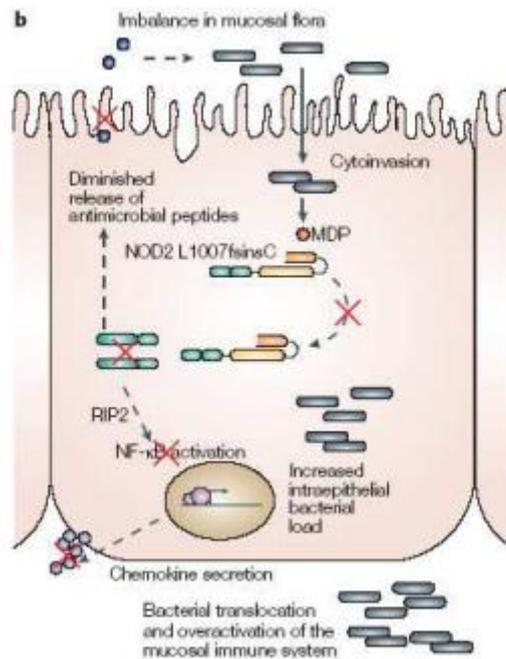


Figure 14: Effet d'une mutation de NOD2 sur l'épithélium intestinal (Schreiber et al, Nat. Rev. Genet., 2005 [46]).

– Polymorphismes de NOD2 : Trois variants 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 [12]. 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. 33 Quinze pour cent des malades sont homozygotes ou hétérozygotes composites [47,48]. Plus de 40 nouveaux variants beaucoup plus rares ont été recensés à ce jour, mais ils sont présents chez quelques malades seulement. 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. La prévalence de la MC chez les patients ayant au moins un allèle de susceptibilité au

niveau du gène CARD15 varie entre 27% et 50% chez la plupart des populations européennes de race blanche. L'étude multicentrique publiée par Lesage et al.[13], ayant connu la participation de plusieurs pays européens, avait rapporté une fréquence de 50 %. Des résultats similaires dans l'Europe centrale avaient été publiés. 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 ($p < 0,0001$) [24]. 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 ($p < 0,0001$) [49]. 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 ($p < 0,006$)[50]. 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 [51]. En fin, 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 ($p = 0.0001$) [52]. Par contre, dans les pays scandinaves, caractérisés en

général par une population homogène, les fréquences observées étaient beaucoup plus basses: Dans une étude réalisée en Finlande, 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%. $p < 0.001$)[53]. 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%) [54]. En Danemark, une étude ayant inclus 388 patients atteints de MC, et 796 contrôles, avait retrouvé une fréquence de la mutation de 21% Vs 10% dans le groupe contrôle ($p < 0.001$)[55]. Aux États-Unis, la fréquence de la mutation du gène NOD2 variait entre 36.5 et 45% dans deux études ayant inclus respectivement 201 et 186 patients crohniens [56,57]. Au Canada, cette fréquence était également élevée, estimée à 32.5% dans une cohorte ayant inclus 507 patients crohniens Vs 20% dans le groupe contrôle, et à 45% dans une deuxième étude ayant inclus 231 patients atteints de MC [58, 59]. D'autre part, 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 [60], deux études chinoises ayant inclus 65 et 61 patients crohniens [61,62], et une étude indienne ayant inclus 82 patients [63]. Sachant que la caractéristique supplémentaire de ces populations c'est qu'elles soient relativement beaucoup plus homogènes. Dans une étude plus récente menée en Iran, ayant inclus 40 patients atteints de MC, la prévalence de la mutation était de 32%, avec une différence significative par rapport aux contrôles ($p < 0.001$)

[64]. Ceci laisserait supposer que ces mutations pourraient également exister dans la population asiatique.

Dans les pays d'origine arabe comme la 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 [65]. 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 [66]. Dans une étude marocaine moncentrique ayant inclu 101 patients atteints de la MC et 107 patients contrôles [15], 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 les deux variantes. La variante p.Leu1007fsinsC n'a pas été identifiée. (Tableau 3).

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. Ce constat a été appuyé par deux études Israéliennes: la première, incluant des juifs ashkénazes et non ashknazes, avait retrouvée une fréquence de ces mutations de 27% [67], cependant, dans une étude récente réalisée dans le même pays, mais dans une population d'origine arabe, la fréquence de ces mutations était beaucoup plus faible (moins de 9%), sans différence significative avec le groupe contrôle [68].

Ainsi Parmi les trois variantes , celle du p.Gly908Arg est la moins fréquente dans la population caucasienne [10,49, 69, 70], et la principale variante chez les

Tunisiens [66] et dans la série marocaine (I.Hama Et al.)[15]. 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 [13, 71], était absente chez tous nos patients, elle était présente chez deux patients dans la série marocaine étudiée par I.Hama et al.[15]

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) et d'un polymorphisme c. 2105G→C (p.Gly702Asp) au niveau de l'exon 4 chez un patient. En effet, ce dernier polymorphisme n'a été rapporté chez aucune population, à part la série marocaine de I.Hama et al [15], 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 nationale voire maghrébine

Tableau 3 : fréquence (%) des trois variantes du gène CARD15/Nod2 dans différents groupes ethniques

Population	Nombre de patients		R702W		G908R		1007fs	
	MC	C	MC	C	MC	C	MC	C
Chine [61]	65	-	0,00	-	0.00	-	0.00	-
Japon [60]	350	-	0.00	-	0.00	-	0.00	-
France [51]	205	95	11.58	4.7	3.7	1.6	9	4.2
Belgique [49]	570	165	12.9	5.8	6	1.8	8.6	3
Italie [50]	316	205	8.7	4.1	7.3	2.7	9.3	0.7
Allemagne [52]	180	97	7.2	3.6	4.2	2.1	12.2	2.1
Finlande [53]	198	300	3.3	1.8	0.6	0.00	4.8	1.7
Danemark [55]	388	796	0.00	1.5	2.6	1.0	16.4	2.1
Grande Bretagne [25]	244	130	12.5	5.2	3.3	1.4	9.4	1.6
Tunisie [66]	101	90	0.02	0.006	0.05	0.03	0.01	0.00
Maroc (rabat) [15]	101	107	0.49	0.46	6.43	2.8	0.99	0.00
Maroc (Fès)	102	-	0.98	-	0.98	-	0.00	-
	117	-	1,7	-	1,7	-	0.00	-

MC : patients atteints de la maladie de crohn

C : groupe contrôle

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 [72].

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 [73]. D'autres études avaient observé que la mutation NOD2/CARD15 était inversement corrélée à la localisation colique de la maladie [13,57]. Notre série, où une fréquence très faible des trois variantes a été notée, confirme ce résultat, puisqu'elle est caractérisée par la prédominance de la localisation colique de la maladie (72.5% des cas). Ce résultat pourrait être expliqué par la différence importante entre les mécanismes de défense immunitaires au niveau de l'iléon et du colon, ce dernier pourrait utiliser des mécanismes immunologiques indépendants de la fonction de la protéine CARD15 [74].

Les enfants atteints de MC et porteurs d'une mutation NOD2 sont susceptibles de recourir plus tôt à la chirurgie que les autres [75].

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 [76]. Malgré tout, à l'heure actuelle le génotypage systématique n'est pas recommandé.

CONCLUSION

Notre série se caractérise par une fréquence très faible des variantes R702W, G908R (0,04% avec IC95% [0,009, 0,07]) 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.

REFERENCES

1. Jimmy Z. et al. Genetic studies of Crohn's disease: Past, present and future. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 28 (2014) 373–386.
2. Crohn, B.B., L. Ginzburg, and G.D. Oppenheimer, Regional ileitis; a pathologic and clinical entity. *Am J Med*, 1952. 13(5): p. 583–90.
3. Gaya DR, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J. New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *Lancet* 2006;367:1271– 84.
4. Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126:1504–17.
5. Shiva Yazdanyar, Maren Weischer, and Børge G. Nordestgaard. Genotyping for *NOD2* Genetic Variants and Crohn Disease: a Metaanalysis. *Clinical Chemistry* 55:11. 1950–1957 (2009).
6. Kek Heng CHUA, Ida HILMI, Ching Ching NG, et al. Identification of *NOD2/CARD15* mutations in Malaysian patients with Crohn's disease. *Journal of Digestive Diseases* 2009; 10; 124–130.
7. Hugot, J.P., et al., 1996. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 379, 821–823.
8. 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.
9. 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.
10. 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.

11. 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.
12. AHMAD, T., A. ARMUZZI, M. BUNCE, et al. 2002. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 122: 854–866.
13. 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.
14. Adler, J., Rangwalla, S.C., Dwamena, B.A., Higgins, P.D., 2011. The prognostic power of the NOD2 genotype for complicated Crohn's disease: a meta–analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 699–712.
15. I. Hama. I. Ratbi, et al. Non–association of Crohn's disease with NOD2 gene variants in Moroccan patients. *Gene* 499 (2012) 121–123.
16. Mc Cole DF. IBD Candidate Genes and Intestinal Barrier Regulation. *Inflamm Bowel Dis.* 2014 Oct;20(10):1829–1849.
17. 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: July 6, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0116044
18. Kek Heng Chua et al. Association between genetic polymorphisms in interferon regulatory factor 5 (IRF5) gene and Malaysian patients with Crohn's disease ; *Journal of Digestive Diseases.* Volume 16, Issue 4, pages 205–216, April 2015
19. Kaida Ning et al. Improved integrative framework combining association data with gene expression features to prioritize Crohn's disease genes. *Hum. Mol. Genet.* (2015)doi: 10.1093/hmg/ddv142First published online: May 1, 2015

20. Yang, Suk-Kyun MD Immunochip Analysis Identification of 6 Additional Susceptibility Loci for Crohn's Disease in Koreans. *Inflammatory Bowel Diseases*: January 2015 – Volume 21 – Issue 1 – p 1–7
21. HUGOT, J.P., J.P. C´EZARD, C JF, et al. 2003. Clustering of Crohn's disease within affected sibships. *Eur. J. Hum. Genet.* 11: 179–184.
22. 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.
23. PELTEKOVA, V.D., R.F. WINTLE, L.A. RUBIN, et al. 2004. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat. Genet.* 36: 471–475.
24. 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.
25. HAMPE, J., A. CUTHBERT, P.J. CROUCHER, et al. 2001. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 357: 1925–1928.
26. Lamoril, J., Deybach, et al, Genetic aspects of Crohn's disease: a review. *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée*, 2007. 22: p. 137–150.
27. GUTIERREZ, O., C. PIPAON, N. INOHARA, et al. 2002. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor- κ B activation. *J. Biol. Chem.* 277: 41701–41705
28. BERREBI, D., R. MAUDINAS, J.P. HUGOT, et al. 2003. CARD15 overexpression in inflamed Crohn's disease colons by mononuclear and epithelial cells. *Gut* 52: 840–846.
29. TRAVASSOS, L.H., S.E. GIRARDIN, D.J. PHILPOTT, et al. 2004. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.* 5: 1000–1006

30. KOBAYASHI, K.S., M. CHAMAILLARD, Y. OGURA, et al. 2005. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307: 731-734.
31. Elphick DA, Mahida YR. Paneth cells : their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut* 2005 ; 54 : 1802-9.
32. INOHARA,N.,Y.OGURA, FF.CHEN, et al. 2001.HumanNod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* 276: 2551-2554.
33. LALA, S., Y. OGURA, C. OSBORNE, et al. 2003. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for Paneth cells. *Gastroenterology* 125: 47-57.
34. OGURA, Y., S. LALA, W. XIN, et al. 2003. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 52: 1591-1597.
35. WATANABE, T., A. KITANI, P.J. MURRAY&W. STROBER. 2004. NOD2 is a negative regulator of toll like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat. Immunol.* 5: 800-808.
36. Kobayashi, K.S., et al., Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*, 2005. 307(5710): p. 731-4.
37. Yamamoto-Furusho, J.K. and D.K. Podolsky, Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 2007. 13(42): p. 5577-80.
38. 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.
39. Philpott, D.J. and S.E. Girardin, Crohn's disease-associated Nod2 mutants reduce IL10 transcription. *Nat Immunol*, 2009. 10(5): p. 455-7.
40. Wehkamp, J., et al., NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*, 2004. 53(11): p. 1658-64.

41. Wehkamp, J., et al., Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2002. 14(7): p. 745–52.
42. Yamamoto-Furusho, J.K., et al., MDP-NOD2 stimulation induces HNP-1 secretion, which contributes to NOD2 antibacterial function. *Inflamm Bowel Dis*, 2010. 16(5): p. 736–42.
43. Simms, L.A., et al., Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut*, 2008. 57(7): p. 903–10.
44. Cooney, R., et al., NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med*, 2010. 16(1): p. 90–7.
45. Bruns, T., et al., NOD2 gene variants are a risk factor for culture-positive spontaneous bacterial peritonitis and monomicrobial bacterascites in cirrhosis. *Liver Int*, 2011.
46. Schreiber, S., et al., Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat Rev Genet*, 2005. 6(5): p. 376–88.
47. Desreumaux, P., [NOD2/CARD15 and Crohn's disease]. *Gastroenterol Clin Biol*, 2005. 29(6–7): p. 696–700.
48. Riis, L., et al., The prevalence of genetic and serologic markers in an unselected European population-based cohort of IBD patients. *Inflamm Bowel Dis*, 2007. 13(1): p. 24–32.
49. 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.

50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. Kugathasan S, Collins N, Maresso K, et al. CARD15 gene mutations and risk for early surgery in pediatric-onset Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 1003-9.

58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. Derakhshan F, Naderi N, Farnood A, et al. Frequency of three common mutations of CARD15/NOD2 gene in Iranian IBD patients. *Indian J Gastroenterol* 2008; 27: 8–11.
65. 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.
66. Zouiten–Mekki L, Zaouali H, Boubaker J, et al. CARD15/NOD2 in a Tunisian population with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2005; 50:130–5.

67. Fidder HH, Olschwang S, Avidan B, et al. Association between mutations in the CARD15 (NOD2) gene and Crohn's disease in Israeli Jewish patients. *Am J Med Genet A* 2003; 121: 240–4.
68. Karban A, Atia O, Leitersdorf E, et al. The relation between NOD2/CARD15 mutations and the prevalence and phenotypic heterogeneity of Crohn's disease: lessons from the Israeli Arab Crohn's disease cohort. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1692–7.
69. Hampe et al . 2002, Association of NOD2 (CARD15) genotype and the clinical course of crohn's disease : a cohort study. *Lancet* 359, 1661– 1665, 2002;
70. van der Linde et al. CARD 15 mutations in Dutch familial and sporadic inflammatory bowel disease and an overview of european studies. *Eur.J.Gastroenterol. Hepato.* 19, 449–459. 2007)
71. Adler et al., 2011 The prognostic power of the NOD2 genotype for complicated crohn's disease : a metanalysis. *Am.J.Gastroenterol.* 106, 699–712;
72. Pascoe, L., et al., Estimating the odds ratios of Crohndisease for the main CARD15/NOD2 mutations using a conditional maximum likelihood method in pedigrees collected via affectedfamilymembers. *Eur J Hum Genet*, 2007. 15(8): p. 864–71.
73. Cuthbert, A.P., et al., The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatoryboweldisease. *Gastroenterology*, 2002. 122(4): p. 867–74
74. Colombel JF. The CARD15 (also known as NOD2) gene in Crohn's disease: Are there implications for current clinical practice? *Clin Gastreterol Hepatol* 2003; 1: 5–9.
75. Lacher, M., et al., NOD2 mutations predict the risk for surgery in pediatric-onsetCrohn'sdisease. *J PediatrSurg*, 2010. 45(8): p. 1591–7.
76. Niess, J.H., et al., NOD2 PolymorphismPredictsResponse to Treatment in Crohn'sDiseaseFirstSteps to a PersonalizedTherapy. *DigDisSci*, 2011