

**ROYAUME DU MAROC**  
**UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH**  
**FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE**  
**FES**



**PREVALENCE DE LA MUTATION NOD2/CARD15 CHEZ LES PATIENTS  
PORTEURS D'UNE MALADIE DE CROHN  
RESULTATS DE L'ETUDE PROSPECTIVE NOD2 FES**

**MEMOIRE PRESENTE PAR :**  
**Docteur EL FILALI FATIMA ZAHRA**  
Née le 07 Juin 1984 à Rabat

**POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE SPECIALITE EN MEDECINE**  
**OPTION : Hépto-gastroentérologie**

**Sous la direction de :**  
**Professeur MELLOUKI IHSANE**  
**Professeur EL ABKARI MOHAMMED**

Mai 2014

# PLAN

RESUME .....	2
Introduction .....	6
Matériel et méthodes .....	9
A. Critères d'inclusion .....	11
B. Déroulement de l'étude .....	11
C. Analyse statistique .....	16
Résultats .....	19
A. Données épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques .....	20
B. Résultats de l'étude génétique.....	25
Discussion .....	29
Conclusion et perspectives .....	42
Références .....	44

# RESUME

### Introduction :

La maladie de crohn en plus de la colite ulcéreuse, est l'une des deux formes principales des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. 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. 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 liées 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 1007Fs et de déterminer la relation entre les caractéristiques phénotypiques de la maladie et la présence de cette mutation.

### Matériels et méthodes :

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, quelque soit le stade évolutif et la localisation de la maladie, ainsi que les patients nouvellement diagnostiqués. 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. Les données étaient recueillies sur une fiche pré établie. Nous avons analysé les caractéristiques épidémiologiques, cliniques, endoscopiques, thérapeutiques et évolutives des patients.

### Résultats :

Cent vingt patients ont été inclus jusqu'à Aout 2014, dont 102 ont bénéficié d'un séquençage de l'ADN. L'âge moyen était de 34.55ans [17-74 ans]. Le sexe ratio F/H était de 1.61. 77.5% 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 70 patients (68.6%), 28 patients (27.5%) avaient une poussée modérée, tandis que 11 patients (10.8%) avaient une poussée sévère. Trente sept patients (36.3%) avaient des manifestations articulaires associées, et 36.27% avaient une localisation iléo colique. La maladie était luminale chez 69.6% des cas, sténosante chez 29.4% des cas, fistulisante chez 19.6% des cas et ano-périnéale chez 19.6% 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 0,04% avec IC95% [0,009, 0,07] .La variante 1007Fs était absente dans notre série. Ces constatations ont été déjà retrouvées lors des résultats préliminaires de ce travail sur 72 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 69.6% 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.

# INTRODUCTION

La maladie de crohn en plus de la colite ulcéreuse, est l'une des deux formes principales des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [1].

Elle est caractérisée par une inflammation transmurale, pouvant atteindre n'importe quel segment du tube digestif depuis l'oropharynx jusqu'à la région ano périnéale [2]. 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 [3,4].

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 [1,5].

Le premier gène de susceptibilité de la maladie était découvert en 1996 sur le chromosome 16 [6]. 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 [7,8]. Ce gène est impliqué dans la réponse immunitaire innée dirigée contre les composantes de la paroi cellulaire bactérienne [4, 9,10]. Plus de 60 variations de la séquence du gène NOD2/CARD15 ont été rapportées [11]. 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 [9, 10]. Ces mutations ont été décrites surtout dans la population caucasienne [12, 13].

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 [14].

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 bi-hebdomadaire 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).



- 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

Ø 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.

Ø 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.

Ø 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 :

Ø 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 de grades.

Ø 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.

Ø Purification de la réaction de séquence avec le Kit BigDye-X Terminator :

- 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: « X Terminator 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 Applied Biosystem*) 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 D'INCLUSION |\_\_|\_\_| |\_\_|\_\_| |\_\_|\_\_|

NUMERO D'ORDRE :

NOM DU SUJET :

PRENOM DU SUJET :

DATE DE NAISSANCE |\_\_|\_\_| |\_\_|\_\_| |\_\_|\_\_|

AGE |\_\_|\_\_| ans

Masculin

SEXE

Féminin

AGE DE DECOUVERTE DE LA MALADIE : |\_\_| ans

ORIGINE : .....

.....

ADRESSE : .....

.....

MILIEU :  U

R

TEL .....

Siège de l'attente du parent :

iléale colique ileo colique

MAP

duodénum

5. ATCD de maladie articulaire familiale.

Oui non

Si oui, lien de

parenté.....

.....

5. autres antécédents :

## CLINIQUE

DATE DE DECOUVERTE DE LA MALADIE :

ANTECEDENTS MEDICO-CHIRURGICAUX

Non Oui

1. tabagisme

2. Notion de consanguinité :

4. ATCD de maladie inflammatoire  
intestinale familiale.

Si oui, lien de parenté :

.....

Premier degré : père mère frère sœurs  
enfant

Deuxième degré : oncle tante neveux  
cousin

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

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

#### LOCALISATION DE LA MALADIE

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

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

#### FORME DE LA MALADIE

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

#### PROFIL EVOLUTIF

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

# RESULTATS

Jusqu'à Aout 2014, 120 patients étaient inclus, dont 102 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 34.55ans [17-74 ans]. Le sexe ratio F/H était de 1.61. 77.5% 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 70 patients (68.6%), par des douleurs abdominales chez 48 patients(47.1%) dont 24 cas sous forme de syndrome de Koenig, elle était diagnostiquée devant un syndrome dysentérique chez 26 patients (25.5%), devant des manifestations ano périnéales dans 18 cas (17.6%) et devant des signes digestifs hauts à type de vomissement dans neuf cas (Figure 3). Quatorze (13.7%) patients avaient une poussée minime, 28 patients (27.5%) avaient une poussée modérée, tandis que 11 patients (10.8%) avaient une poussée sévère. Une colite aigue grave était le mode de révélation de la maladie chez 4 patients (Figure 4). Trente sept patients (36.3%) avaient des manifestations articulaires associées, 5 patients (4.9%) avaient des manifestations cutanées et 7 patients (6.9%) avaient des manifestations ophtalmologiques (Figure 5). Trente sept patients (36.27%) avaient une localisation iléo colique, et 23 patients avaient une localisation colique isolée (22.54%), une localisation gastrique de la maladie était notée chez 2 cas (Figure 6). La maladie était luminale seule chez 50 patients (49%), sténosante chez 30 patients (29.4%), fistulisante chez 20 patients (19.6%) et ano-périnéale chez 20 cas (19.6%) (Figure 7). 20.6% des patients avaient

recours à la chirurgie (N=21), 50% étaient sous immuno suppresseurs (N=51), et 8.8% étaient sous anti TNF (N=9).

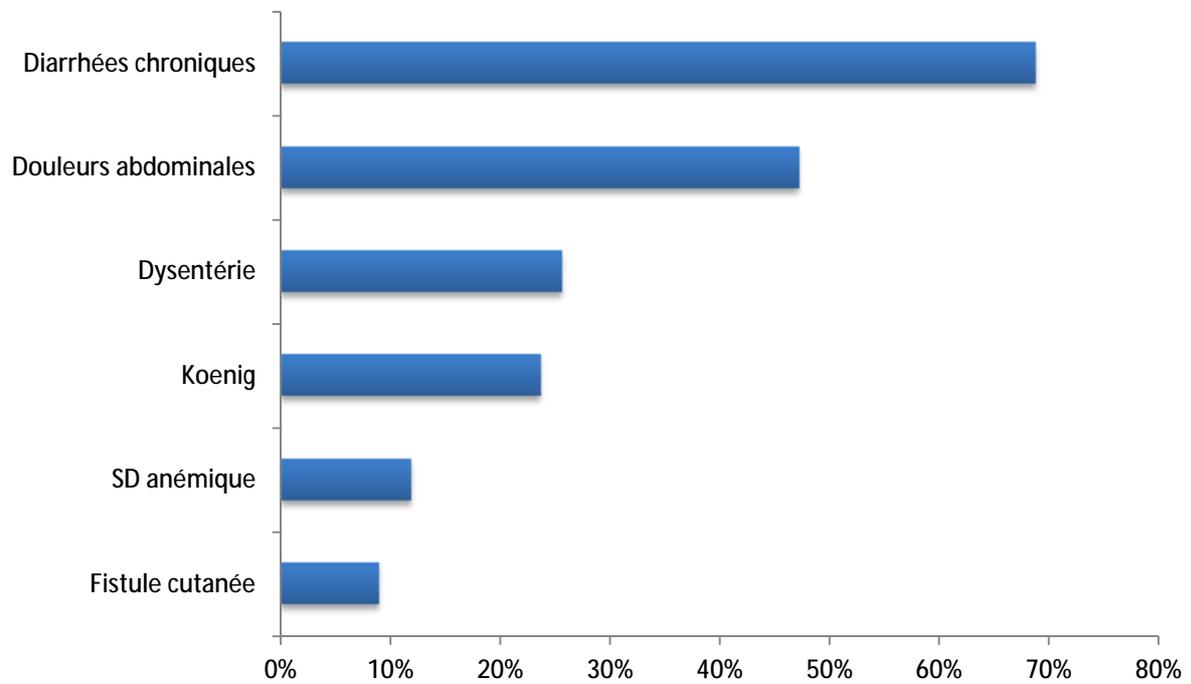


Figure 3 : Circonstances de découvertes

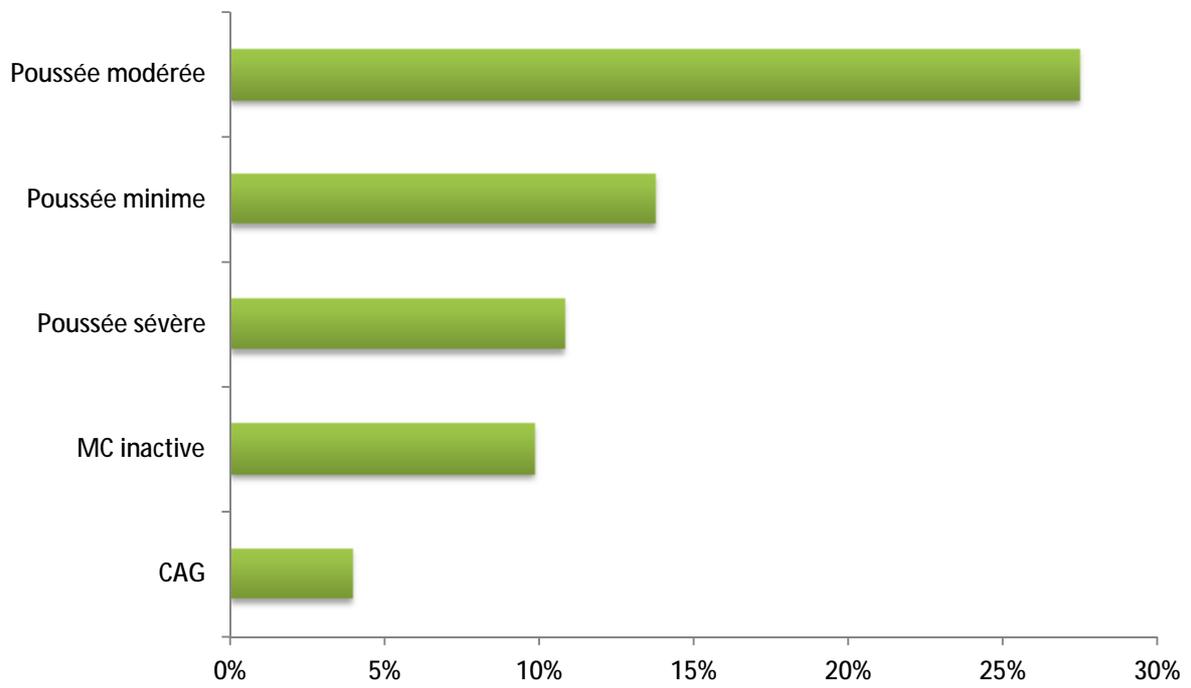


Figure 4 : Activité de la Maladie de crohn

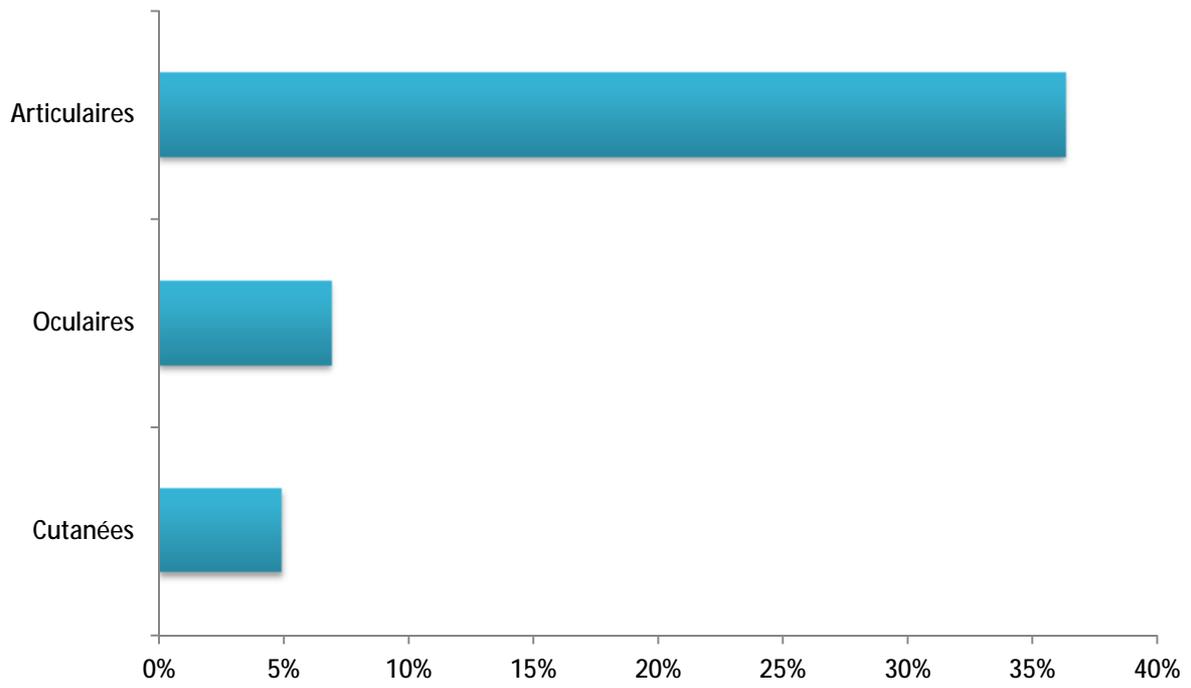


Figure 5 : Manifestations extradigestives

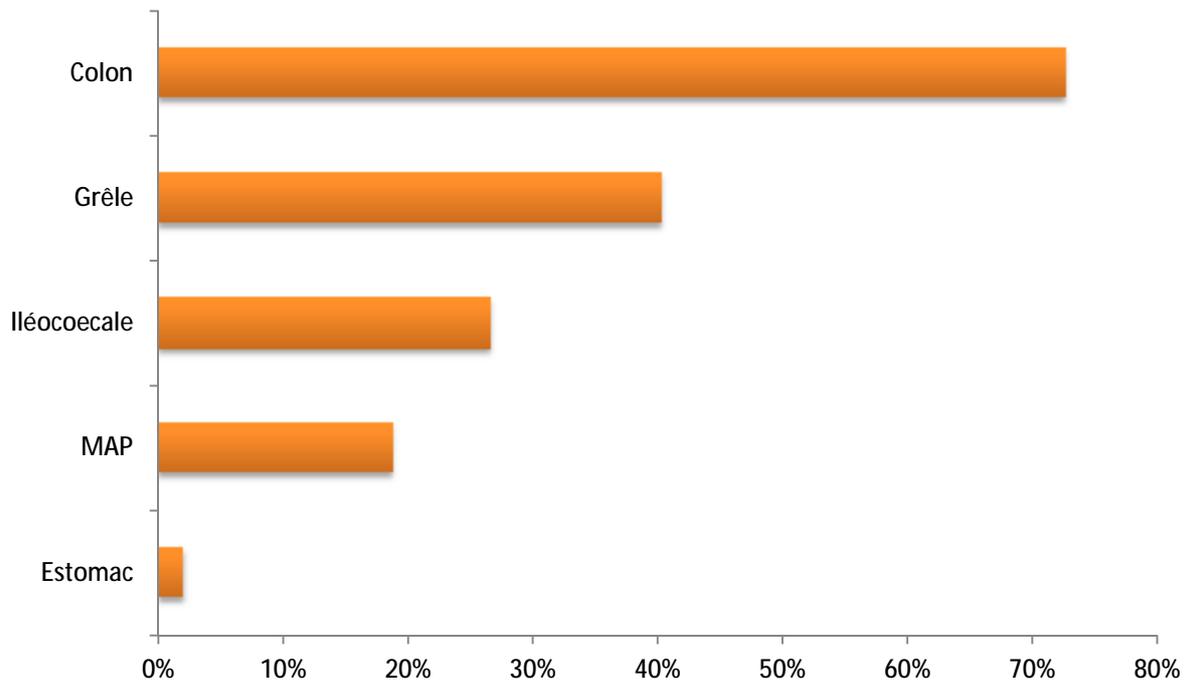


Figure 6 : Localisation de la maladie

Forme de la maladie	Nombre de patients
luminale seule	50
Luminale et sténosante	3
Luminale et fistulissante	2
Luminale et ano périnéale	13
Sténosante seule	11
Sténosante et fistulissante	10
Sténosante et ano périnéale	1
Fistulissante seule	5
Anopérinéale seule	2
Luminale, sténosante et anopérinéale	2

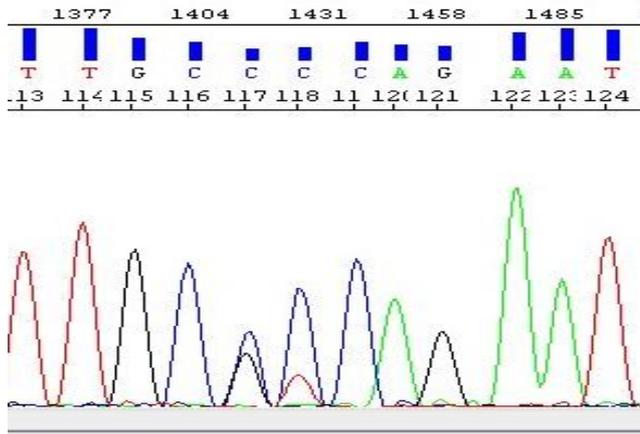
Figure 7 : Formes de la maladie de crohn

## B. Résultats de l'étude génétique :

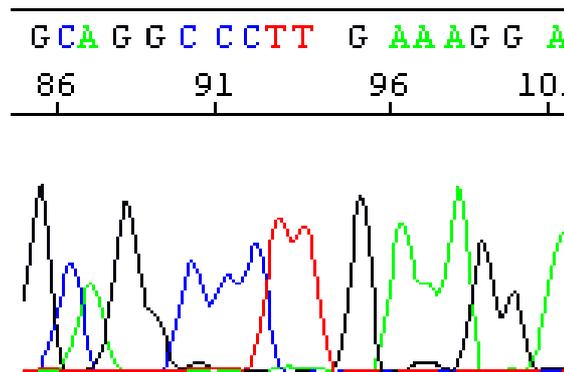
Dans notre série, les trois principales mutations décrites du gène NOD2/CARD15 :

- 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).

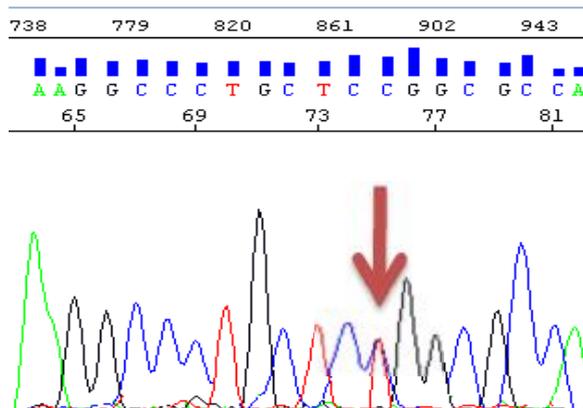
Par ailleurs, l'alignement des séquences des exons 4, 8 et 11 a montré la présence d'un polymorphisme c.2753C-A (p.Ala918Asp) au niveau de l'exon 8 chez 2 patients (Figure 11) et d'un polymorphisme c. 2105G-C (p.Gly702Asp) niveau de l'exon 4 chez un patient.



**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)**



Tableau 2 : Caractéristiques phénotypiques chez les patients avec présence de la variante R702W 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

# DISCUSSION

Des progrès importants de la génétique humaine ont permis de comprendre l'implication de facteurs génétiques dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [15].

Dans ce domaine, des résultats intéressants obtenus récemment, avaient permis de formuler plusieurs hypothèses physiopathologiques conduisant à mieux comprendre la maladie.

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 [16].

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 [11-17], 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)

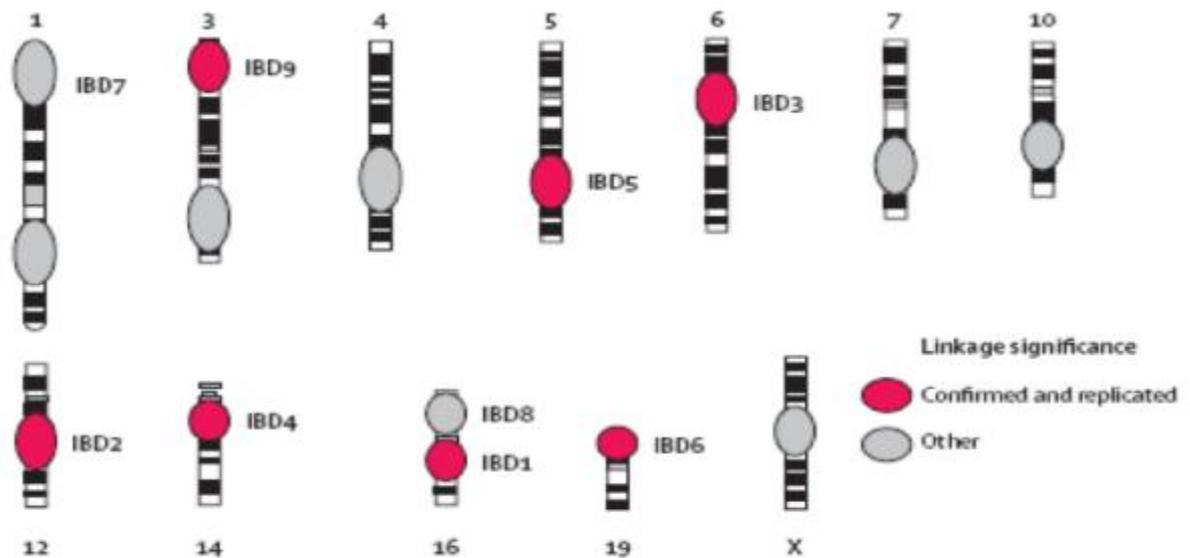


Figure 12 : Gènes de susceptibilité aux MICI identifiés lors de l'analyse du génome humain

Ø 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 [18].

Ø En même temps, des polymorphismes (DLG5), localisés sur le chromosome 10, ont été rapportés par un groupe allemand comme étant associé à la MC [19]. Ces polymorphismes induisent des variations non conservatrices sur la séquence de la protéine, mais leur effet fonctionnel n'a pas encore été testé.

Ø 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 [9,10], et ensuite validées par de nombreuses études [11,20]. D'une manière générale, ces études avaient permis de conclure que NOD2 (nommé plus tard CARD15) était un gène majeur de la MC.

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.

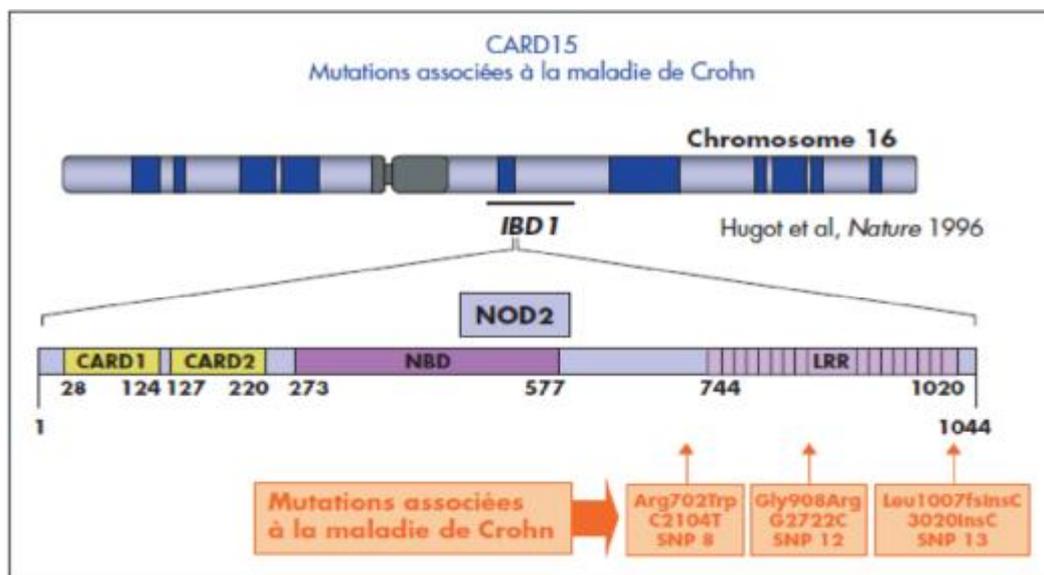


Figure 13 : Structure du gène et de la protéine NOD2/CARD15 d'après [9,10]

- En fin, la partie N-terminale de la protéine, contenant deux domaines CARDS connus par leur rôle dans l'apoptose et dans les voies d'activation NF- $\kappa$ B

La protéine codée par le gène CARD15 est exprimée surtout dans les cellules de la lignée monocyte/macrophage [21,22]. Elle est présente dans le cytoplasme de la cellule et active la voie de signalisation NF- $\kappa$ 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 $\beta$  en participant à l'inflammasome [23]. Il a aussi été montré avoir un rôle dans l'autophagie, dans l'activation de l'interleukine 10, de la synthèse des défensines [24]. 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- $\kappa$ B [23,25].

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 [26]. Elles 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 [27,28]. 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 [29].

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 (figure 14) [12]. 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.

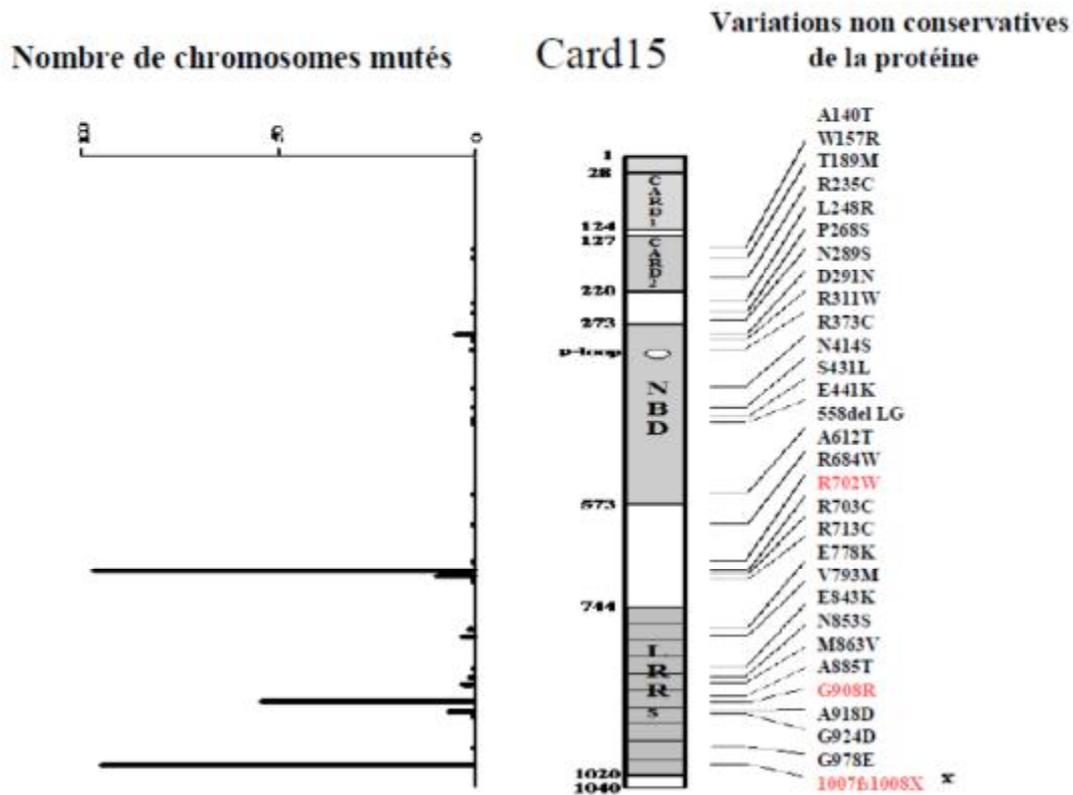


Figure 14 : Variations non conservatives de la protéine Card15/Nod2

Ces trois principales mutations (R702W, G908R et 1007fs), sont présentes chez environ 15% des sujets sains, ainsi, être porteur d'une mutation ne signifie pas être malade. Elles sont retrouvées chez près de 30% des malades, donc deux fois plus souvent que chez les sujets sains. Ainsi, comme attendu pour une maladie génétique complexe, une mutation du gène CARD15/NOD2 n'est pas une condition nécessaire pour l'expression de la maladie.

Les sujets atteints de MC ont souvent une mutation sur les deux gènes portés par leurs deux chromosomes. On parle d'effet dose. Ainsi, 17% des malades sont porteurs de 2 mutations contre 0,3 % des sujets contrôles. On peut alors estimer le risque d'être malade d'environ 20 à 40 fois plus élevé

que la population générale pour les sujets doublement mutés alors que le même risque est de l'ordre de 2 à 3 pour les sujets porteurs d'une seule mutation [9,10,12,30]. Cet effet dose est compatible avec un modèle de perte de fonction, où la mutation au niveau du gène entraîne une diminution de l'efficacité de la protéine correspondante. Ce modèle était confirmé par plusieurs études [10, 31, 32].

D'importantes variations géographiques et démographiques ont été décrites 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.[12], 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 ( $p<0,0001$ ) [19]. 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 ( $p<0,0001$ ) [33]. 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 ( $p < 0,006$ )[34]. 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 [35]. 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 ( $p = 0.0001$ ) [36]. Par contre, dans les pays scandinaves, caractérisés en général par une population homogène, les fréquence observées était beaucoup plus basses: 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%.  $p < 0.001$ )[37]. 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%) [38]. 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 ( $p < 0.001$ ) [39]. 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 [40,41]. 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 [42,43]. 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 [44], deux études chinoises ayant inclu 65 et 61 patients crohniens [45,46], et une étude indienne ayant inclu 82 patients [47]. 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 inclu 40 patients atteints de MC, la prévalence de la mutation était de 32%, avec une différence significative par rapport aux contrôles ( $p < 0.001$ ) [48]. 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 [49]. De même pour la Tunisie, dans une étude ayant intéressé 130 patients crohniens et 90 contrôles, la fréquence de la mutation était tellement basse qu'il n'y avait pas de différence significative avec le groupe contrôle [50]. Dans une étude marocaine moncentrique ayant inclu 101 patients atteints de la MC et 107 patients contrôles [14], 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 0.98 % 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 ashkénazes, avait retrouvée une fréquence de ces mutations de 27% [51], 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 [52].

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 [45]	65	-	0,00	-	0.00	-	0.00	-
Japon [44]	350	-	0.00	-	0.00	-	0.00	-
France [35]	205	95	11.58	4.7	3.7	1.6	9	4.2
Belgique [33]	570	165	12.9	5.8	6	1.8	8.6	3
Italie [34]	316	205	8.7	4.1	7.3	2.7	9.3	0.7
Allemagne [36]	180	97	7.2	3.6	4.2	2.1	12.2	2.1
Finlande [37]	198	300	3.3	1.8	0.6	0.00	4.8	1.7
Danemark [39]	388	796	0.00	1.5	2.6	1.0	16.4	2.1
Grande Bretagne [20]	244		12.5	5.2	3.3	1.4	9.4	1.6
Tunisie [50]	130	90	0.02	0.006	0.05	0.03	0.01	0.00
Maroc (rabat) [14]	101	107	0.49	0.46	6.43	2.8	0.99	0.00
Maroc (Fès)	102	-	0.98	-	0.98	-	0.00	-

MC : patients atteints de la maladie de crohn

C : groupe contrôle

La relation entre la présence des mutations NOD2/CARD15 et le phénotype de la MC a été évoquée de nombreuses études.

Des résultats importants concernant la relation entre la présence de la mutation et la localisation de la maladie avaient été publiés. Dans une étude britannique [20], la présence de ces mutations était significativement corrélée à la localisation iléale de la maladie (OR=4). Ce résultat avait été appuyé par d'autres études dont principalement une méta analyse publiée par Economou [30] (OR=2.53 avec IC de 95% [2.01-3.16]). Une étude australienne très récente a suggéré que les patients porteurs des mutations NOD2 / CARD 15 développent des formes agressives et rapidement évolutives de la maladie de crohn, avec un recours répété et précoce aux interventions chirurgicales [53].

D'autres études avaient observé que la mutation NOD2/CARD15 était inversement corrélée à la localisation colique de la maladie [12,41]. 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 [54].

Bien que les résultats ne soient pas encore très exhaustifs, la méta analyse déjà mentionnée [30] avait rapporté l'existence d'une association entre la mutation CARD15 et la forme sténosante de la maladie (OR=1.94 avec IC de 95% [1.61-2.34]. Ceci avait été confirmé par d'autres études [12,11, 38]. Dans notre série, la forme sténosante de la maladie n'était retrouvée que chez 10,78% des cas (N=11).

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

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. Gaya DR, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J. New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *Lancet* 2006;367:1271– 84.
3. Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126:1504–17.
4. 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).
5. 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.
6. Hugot, J.P., et al., 1996. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 379, 821–823.
7. 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.

8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. AHMAD, T., A. ARMUZZI, M. BUNCE, et al. 2002. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 122: 854–866.
12. 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.
13. 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.
14. I. Hama. I. Ratbi, et al. Non-association of Crohn's disease with NOD2 gene variants in Moroccan patients. *Gene* 499 (2012) 121–123.
15. Mc Cole DF. IBD Candidate Genes and Intestinal Barrier Regulation. *Inflamm Bowel Dis.* 2014 Oct;20(10):1829–1849.

16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. GUTIERREZ, O., C. PIPAON, N. INOHARA, et al. 2002. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor- $\kappa$ B activation. *J. Biol. Chem.* 277: 41701–41705.
22. 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.
23. 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.

24. 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.
25. Elphick DA, Mahida YR. Paneth cells : their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut* 2005 ; 54 : 1802-9.
26. INOHARA,N.,Y.OGURA, FF.CHEN, et al. 2001.HumanNod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* 276: 2551–2554.
27. 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.
28. 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.
29. WATANABE, T., A. KITANI, P.J. MURRAY&W. STROBER. 2004. NOD2 is a negative regulator of toll like receptor 2-medated T helper type 1 responses. *Nat. Immunol.* 5: 800–808.
30. ECONOMOU, M., T.A. TRIKALINOS, K.T. LOIZOU, et al. 2004. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am. J. Gastroenterol.* 99: 2393–2404.
31. CHAMAILLARD, M., D. PHILPOTT, S.E. GIRARDIN, et al. 2003. Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 3455–3460.

32. INOHARA, N. et al. 2003. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. implications for Crohn's disease. *J. Biol. Chem.* 278: 5509–5512.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.

40. 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.
41. Kugathasan S, Collins N, Maresco K, et al. CARD15 gene mutations and risk for early surgery in pediatric-onset Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 1003-9.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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.

48. 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.
49. Uyar FA, Over-Hamzaoğlu 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.
50. 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.
51. Fidler 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.
52. 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.
53. Maneesha Bhullar, et al. Prediction of Crohn's disease aggression through NOD2 /CARD15 gene sequencing in an Australian cohort. *World J Gastroenterol* 2014 May 7; 20(17): 5008-5016.
54. 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.