

MALADIE DE CROHN ET GÈNES DE L'IMMUNITÉ INNÉE NOD2/CARD15 ET TLR 2

- Chaib S¹, Meddour Y¹,
- Kecili L², Kaddache N², Bounab N², Belhocine K²,
Gamar L², Boucekkine T²
- Mammeri D³, Menni W³, Bouseloub A³,
- Nakmouche M⁴.
- Tamouza R⁵
- 1. Service d'Immunologie _ HCA
- 2. Service de Gastro-Enterologie – CHU Mustapha
- 3. Service de Gastro-Enterologie _ HCA
- 4. Service de Gastro-Enterologie _ CHU Bab-Eloued
- 5. Service d'histocompatibilité _ Hopital Saint Louis



INTRODUCTION

- 1993 Strelein JW. (Curr.Opin.Immunol.,5)
- Le phénomène d' »**immunoprivilège** » concerne des organes qui bénéficient d'une **protection immunitaire** tout en évitant une réponse inflammatoire, immunopathologique interférant gravement avec leur physiologie.
- 2006 Iweala OI & Nagler CL (Immunol.Rev.,213)
- L'intestin est considéré comme un paradigme central à ce concept d'organe immunoprivilégié
- Rationnel de ce privilège: tolérer les **deux entités allogènes** auxquelles la muqueuse intestinale est constamment exposée: **les aliments et le microbiote.**



MÉCANISME DE TOLÉRANCE AU MICROBIOTE INTESTINAL

Furtivité

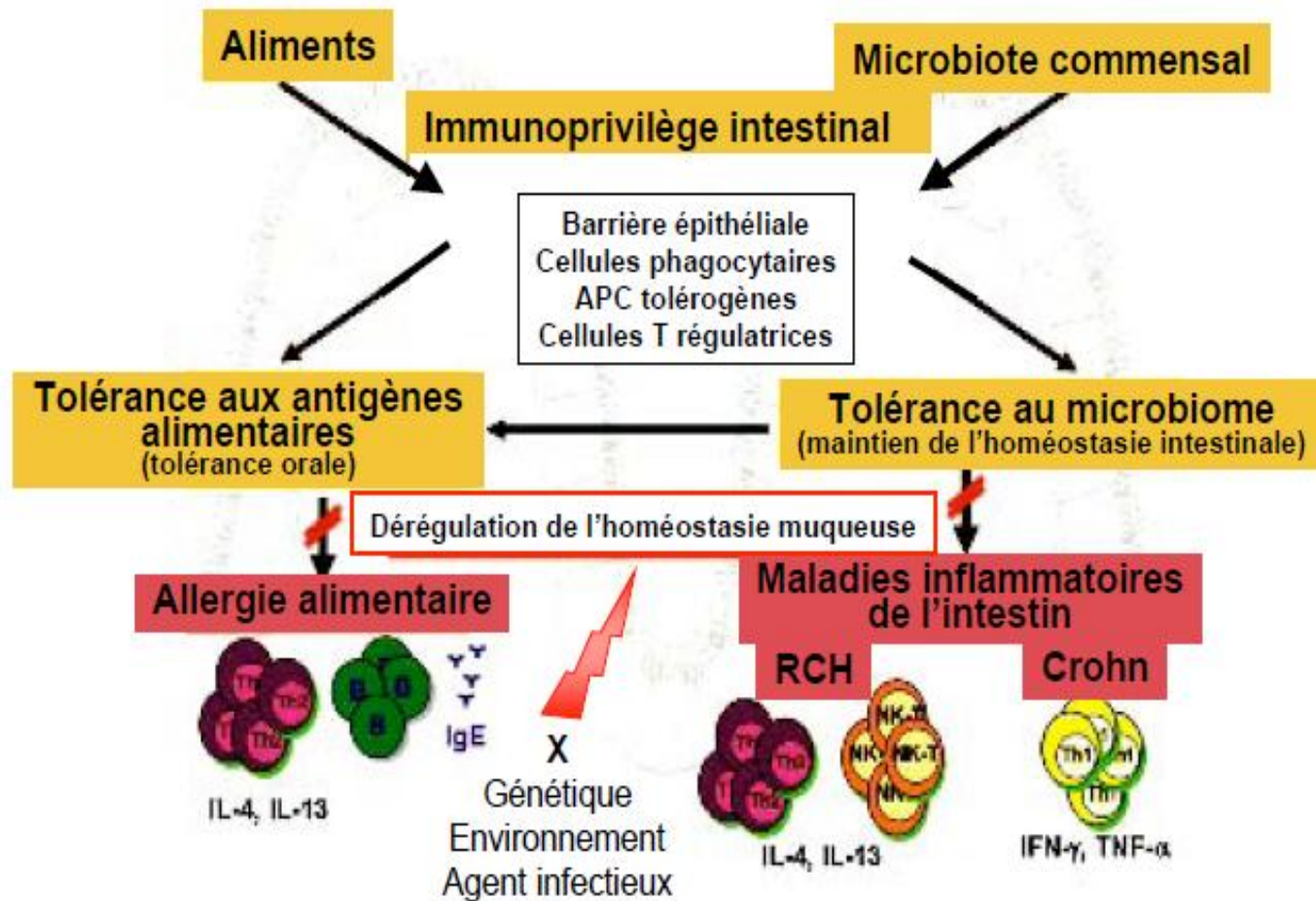
- 1 - Faible reconnaissance des bactéries commensales numériquement dominantes (Bacteroidetes et Firmicutes) et Effet antiinflammatoire de certains commensaux.
- 2 - Maintien à distance des bactéries commensales (mucus, molécules antimicrobiennes, barrière épithéliale, ...)
- 3 - Diminution d'expression et/ou séquestration des TLR au niveau des cellules épithéliales intestinales

Tolérognèse active

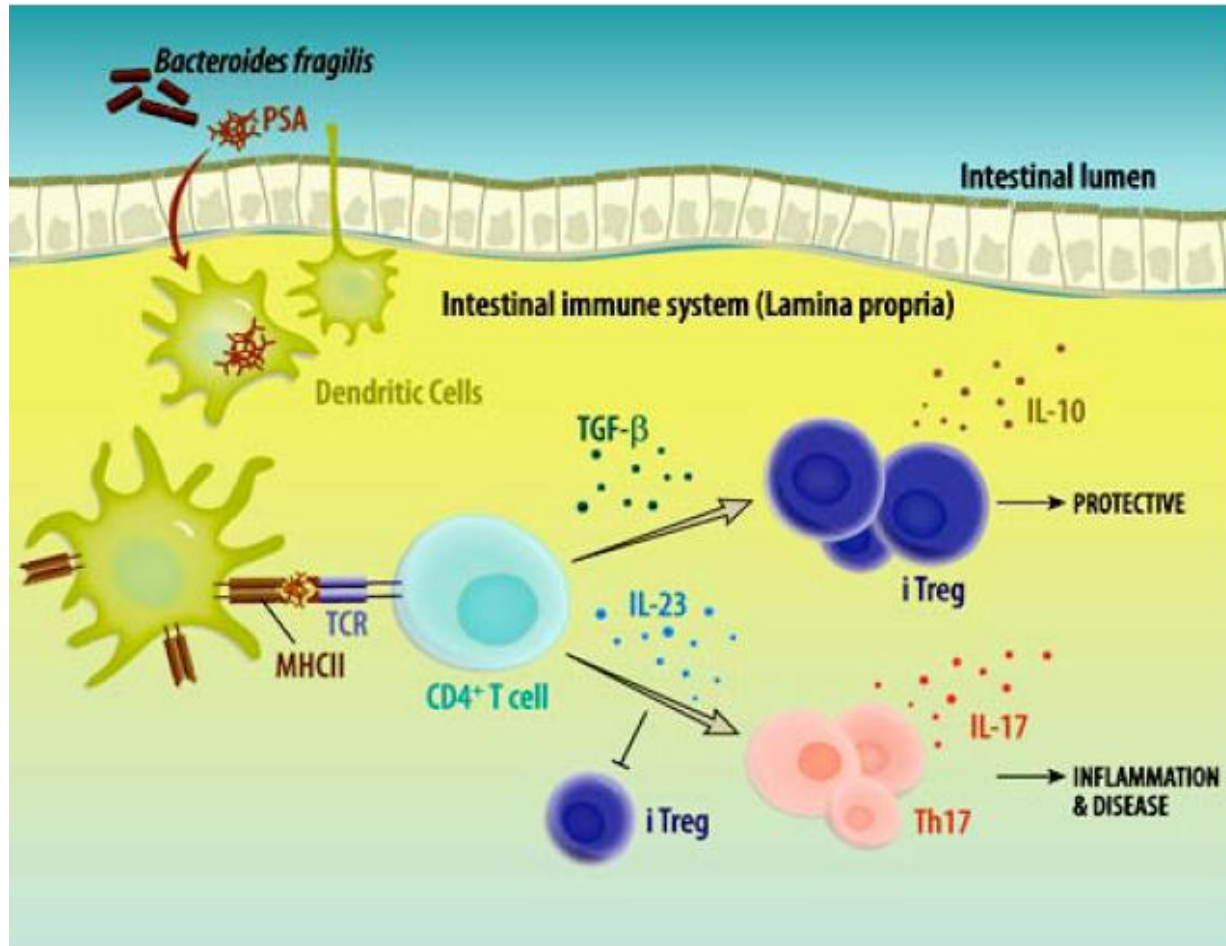
- 4 - Induction de la tolérance au LPS
- 5 - Production d'IgA et compartimentalisation de la réponse aux bactéries commensales
- 6 - Mécanismes de tolérognèse active (T reg)



IMMUNOPRIVILÈGE INTESTINAL : TOLÉRANCE AUX ANTIGÈNES ALIMENTAIRES ET AU MICROBIOTE COMMENSAL

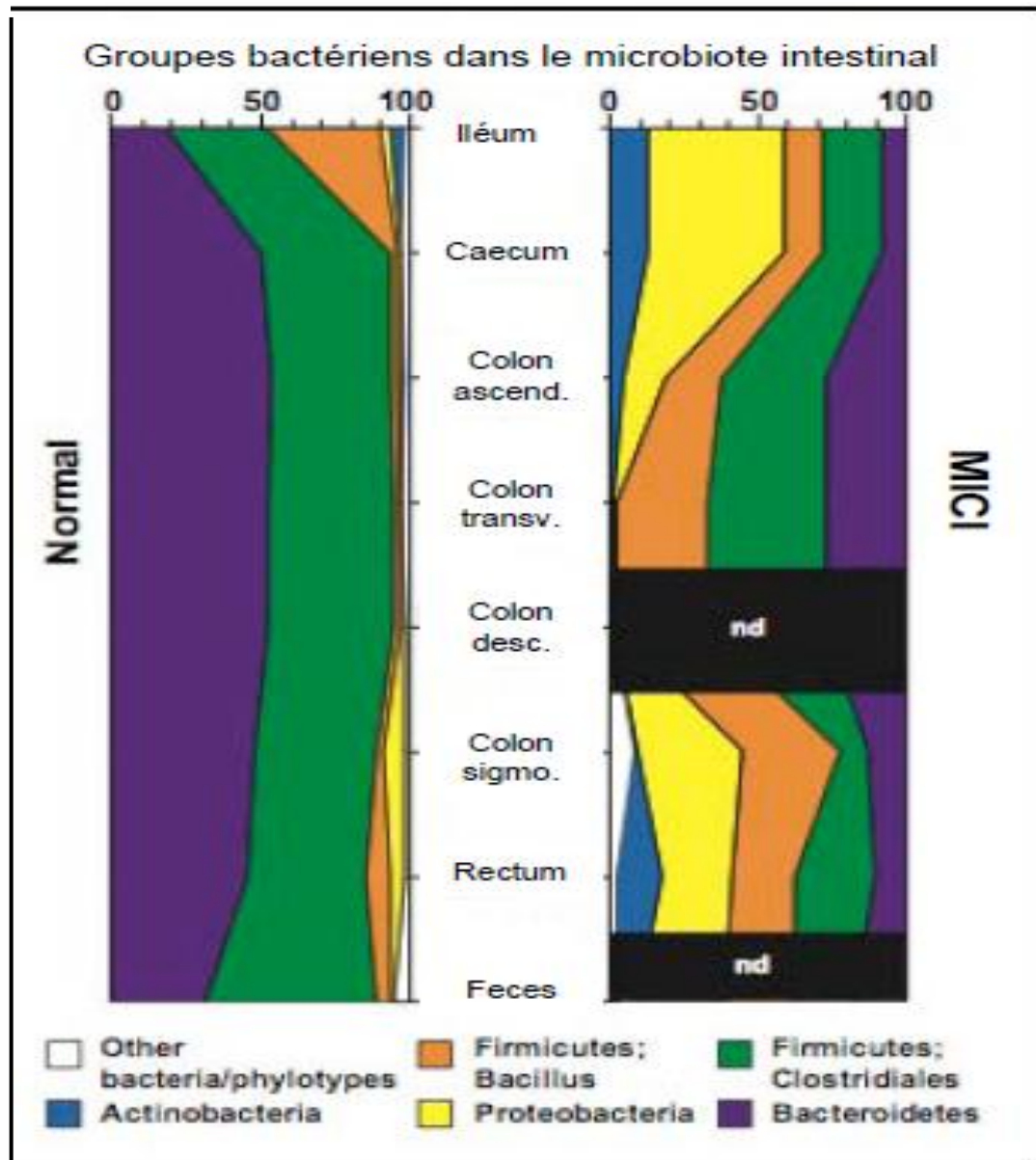


RÔLE ACTIF DU MICROBIOTE DANS LE CONTRÔLE DE L'INFLAMMATION INTESTINALE



D'après Mazmanian SK & Kasper DL. 2006. Nat.Rev.Immunol.

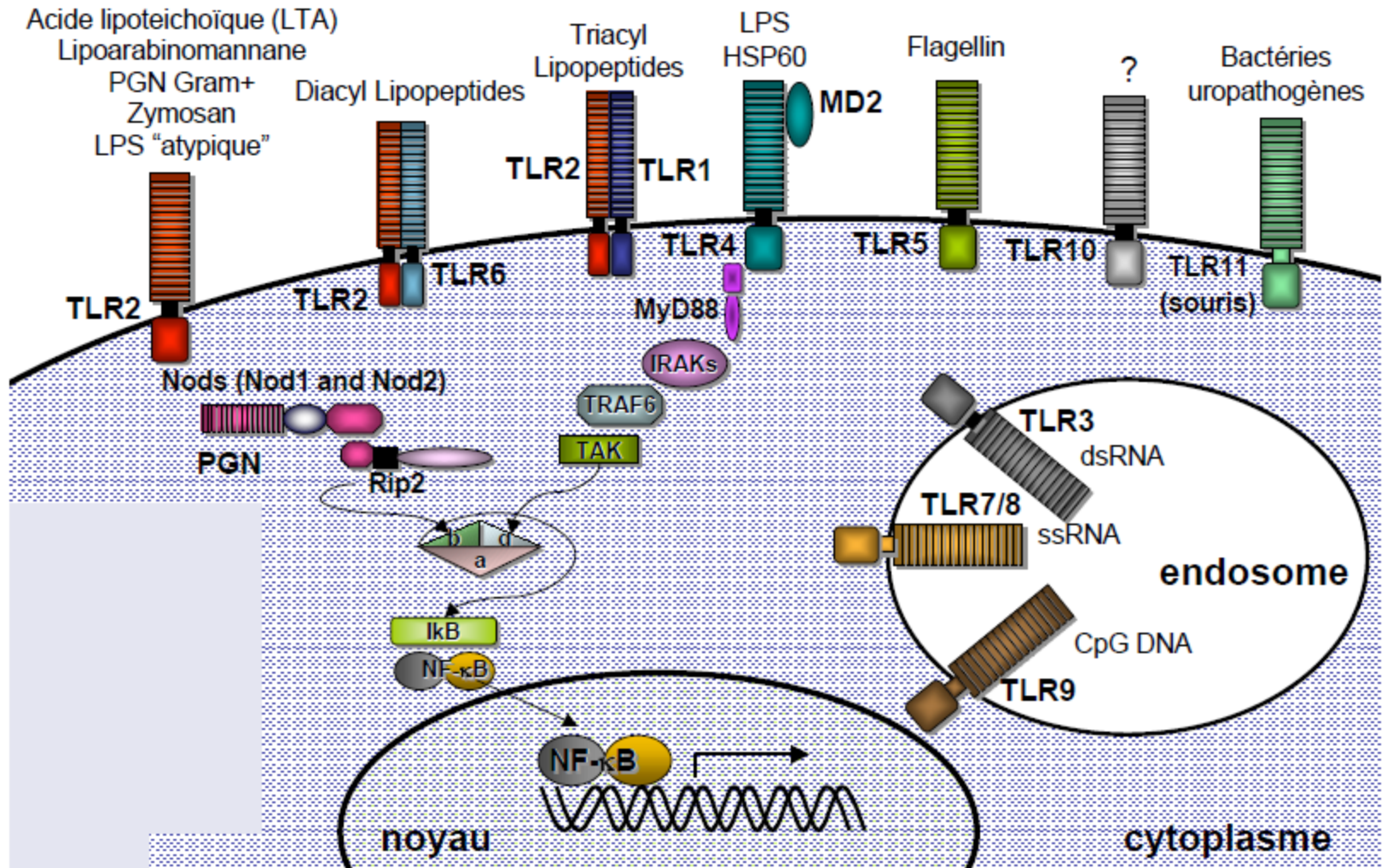


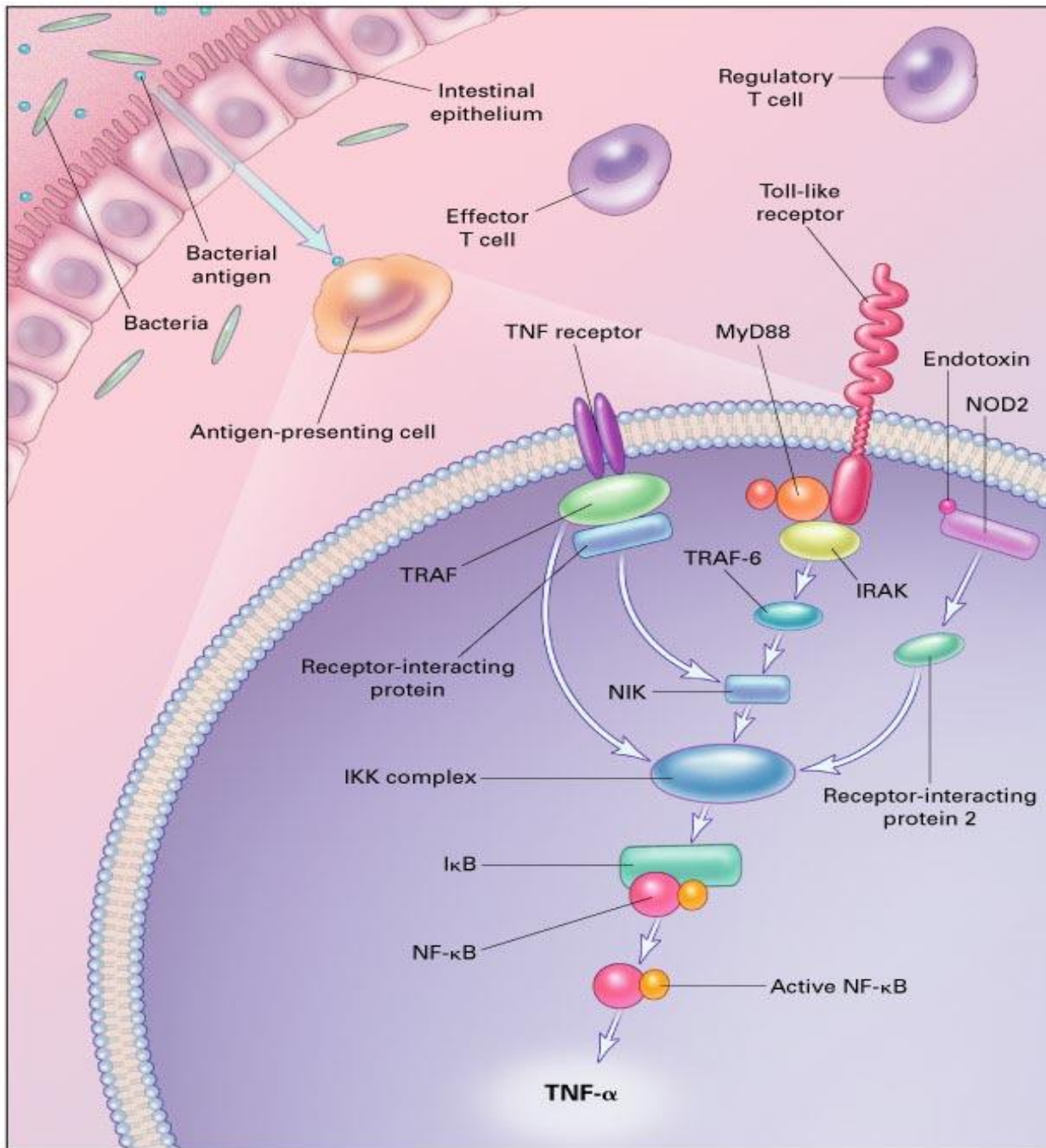


D'après Peterson et coll., 2008



"PATHOGEN RECOGNITION RECEPTORS (PRRs)" & PAMPs

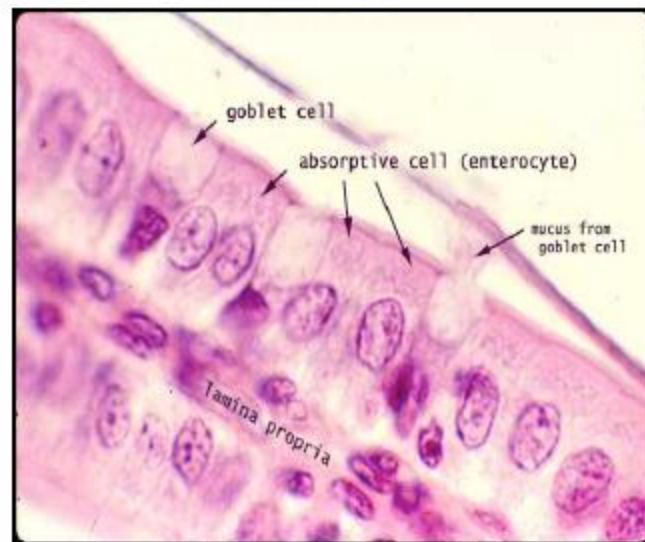
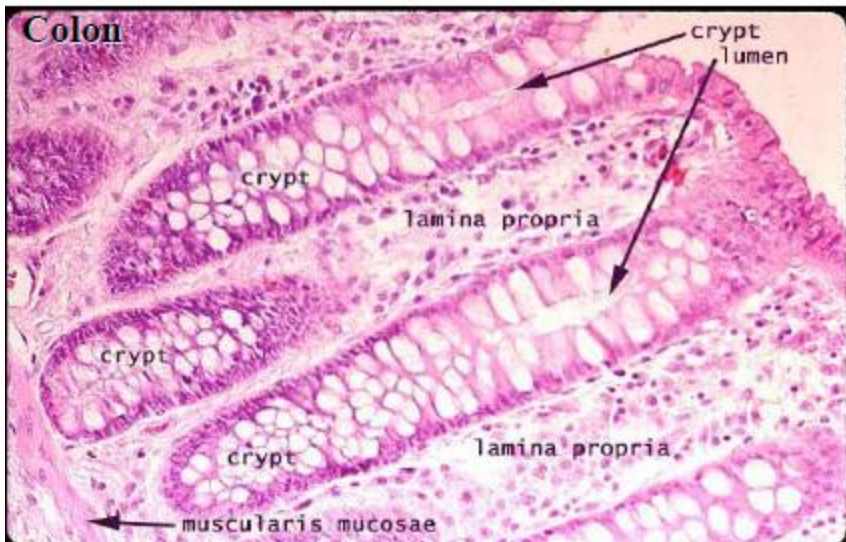
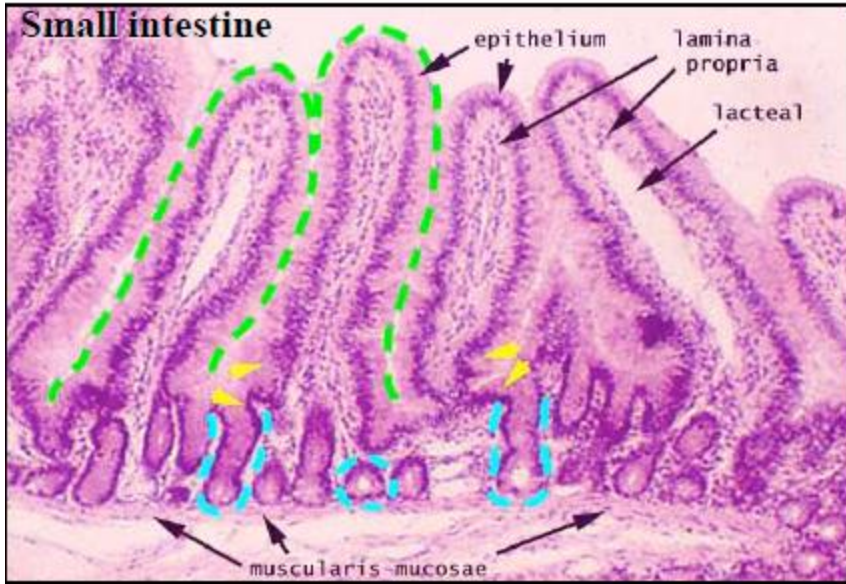




RAPPELS : PHYSIOLOGIE

- Le GALT est composé de sites inducteurs et de sites effecteurs .
- Les sites inducteurs sont les îlots lymphoïdes des **plaques de Peyer** dans l'intestin grêle, les nodules lymphoïdes isolés de l'iléon et du colon et les noeuds lymphatiques mésentériques.
- constitués de **cellules B et T** et de **CPA**, ils ont pour rôle d'identifier l'antigène, le présenter et stimuler les lymphocytes T.
- Le site effecteur est représenté par la **lamina propria** qui héberge des lymphocytes caractéristiques du système immunitaire intestinal. On distingue:
 - les lymphocytes situés dans la muqueuse : les lymphocytes de la lamina propria : **LLP**, d'origine thymique; et les lymphocytes situés dans l'épithélium, les lymphocytes intraépithéliaux: **LIE**
 - LIE ont une action cytolytique en réponse aux antigènes microbiens et aux signaux de stress. **Ces derniers sont particulièrement attentifs aux messages envoyés** par les entérocytes via l'interleukine 7 (IL-7).

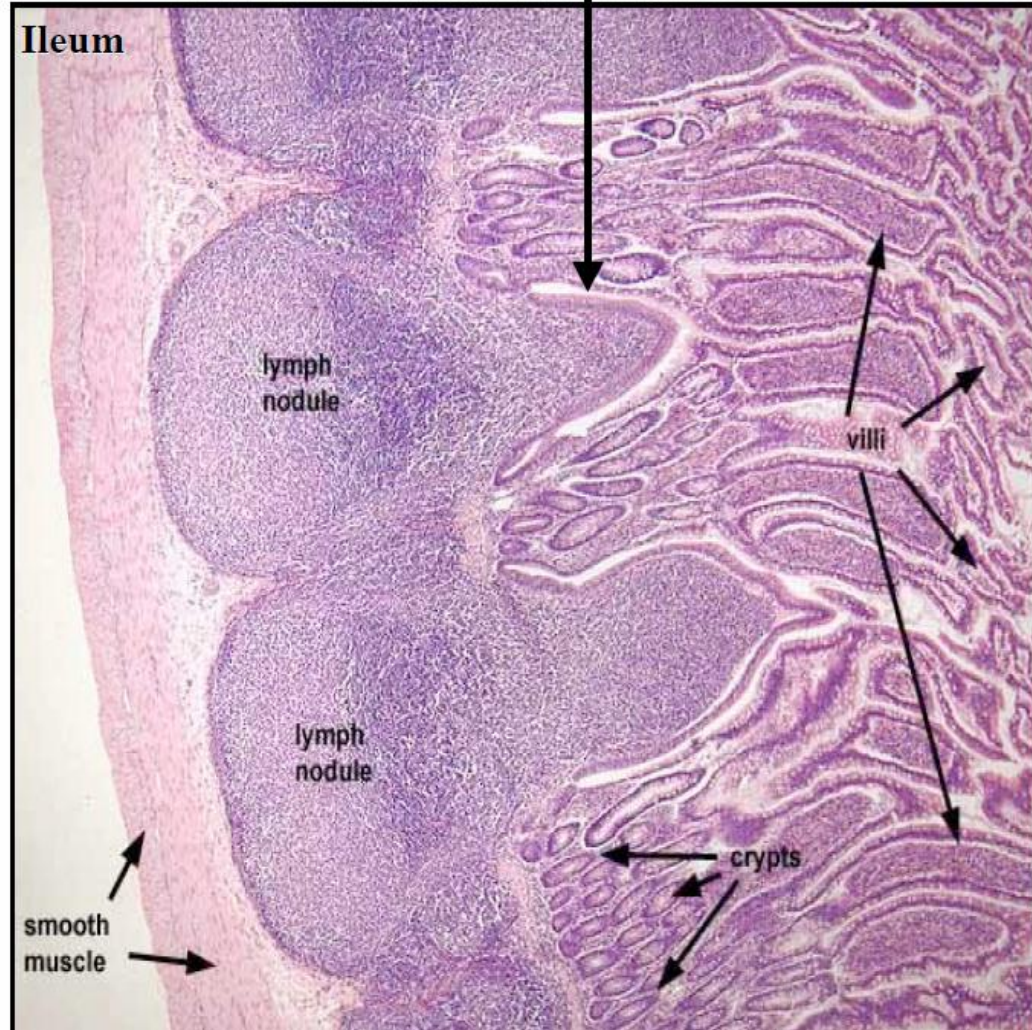
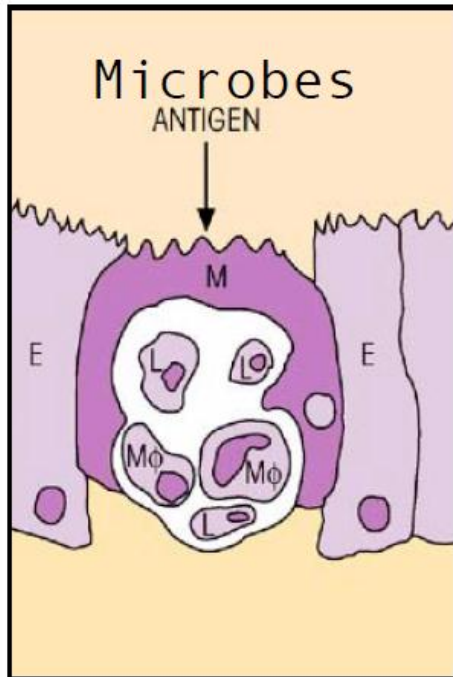


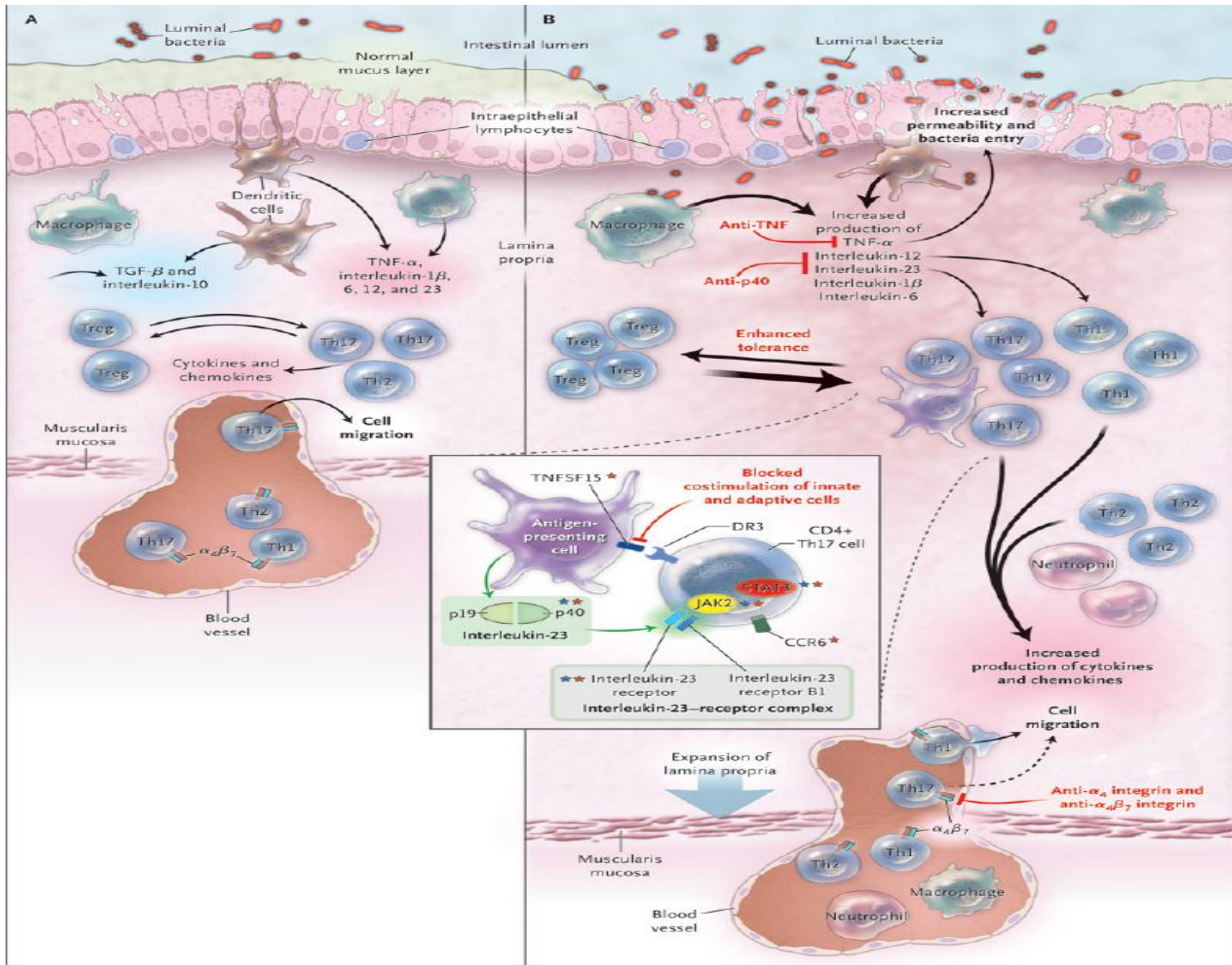


Follicle-Associated Epithelium (FAE)

Plaque de Peyer →

Cellule M ↓





- Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont des maladies multifactorielles.
- Résultent de la combinatoire de plusieurs facteurs de risque: certains sont génétiques et d'autres environnementaux.
- En d'autres termes, la maladie ne survient qu'après exposition à un (des) facteur(s) de risque environnemental (aux) sur un terrain génétiquement prédisposé.
- Ce terrain génétique n'est lui même pas simple à définir et consiste en une **association** plus ou moins complexe **de plusieurs variants génétiques** à risque.
- La maladie (ou phénotype) apparait si patient exposé à une combinatoire de facteurs de risque génétiques et environnementaux.
- Combinatoire est variable d'un sujet à l'autre et module plus ou moins l'expression de la maladie. Il est donc illusoire de rechercher un seul gène de susceptibilité pour les MICI et la définition pertinente d'un risque (conseil génétique) n'est pas possible sans la reconnaissance des nombreux facteurs étiologiques nécessaires à l'expression de la maladie.

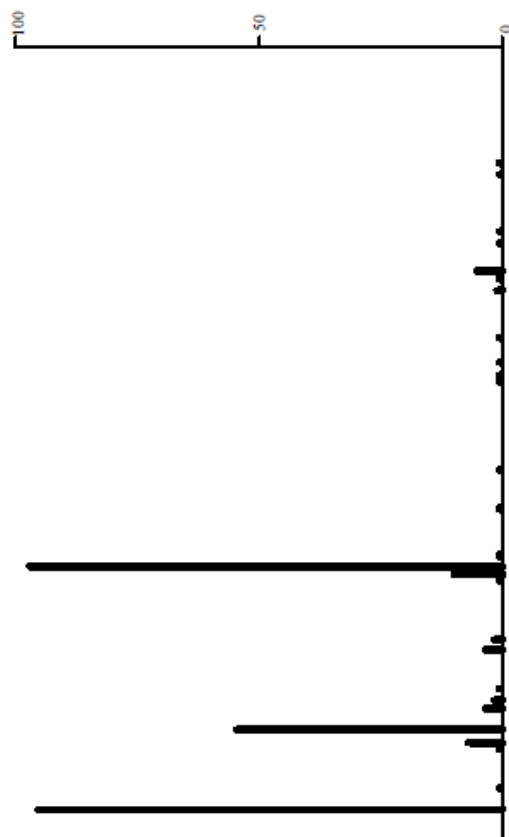


- La maladie de Crohn (MC) est une maladie polygénique où interviennent différents gènes de susceptibilité
- Parmi les régions du génome identifiées par des études de criblage du génome comme zones de susceptibilité, les chromosomes **16, 12, 7** et **3,4**
- Région péri-centromérique du chromosome 16 (IBD1) est la région candidate favorisée car son implication a été confirmée par des études sur différentes cohortes de formes familiales de MC.
- Le gène NOD-2 a été impliqué dans la susceptibilité génétique à la MC par une approche de clonage :
- positionnel (*Hugot JP et al. **Nature 2001***)
- ou par une stratégie de gène candidat (*Ogura Y et al. **Nature 2001***)

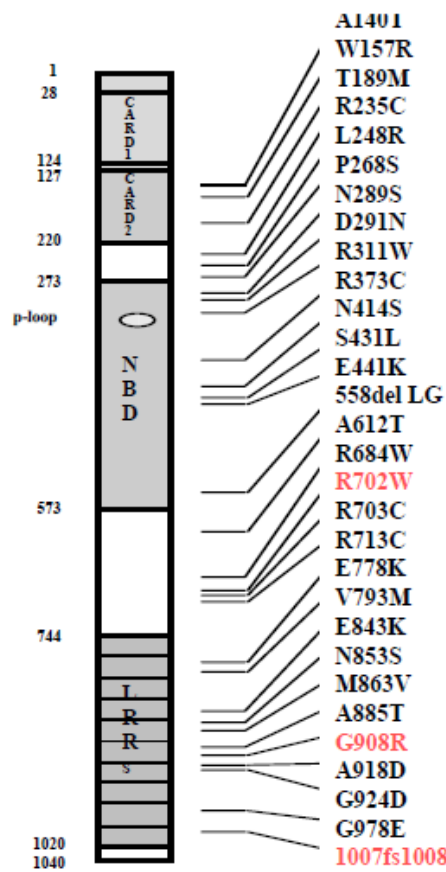


PRINCIPALES MUTATIONS DU GÈNE NOD2/CARD15

Number of mutated chromosomes



Card15



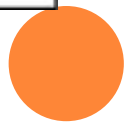
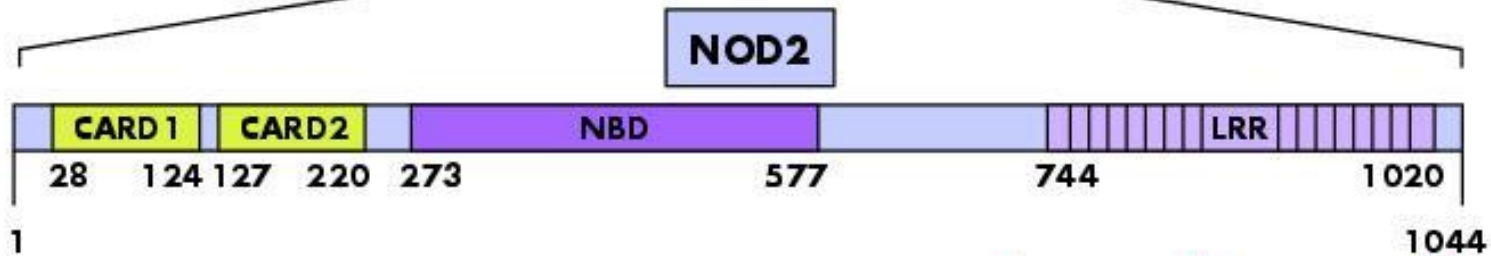
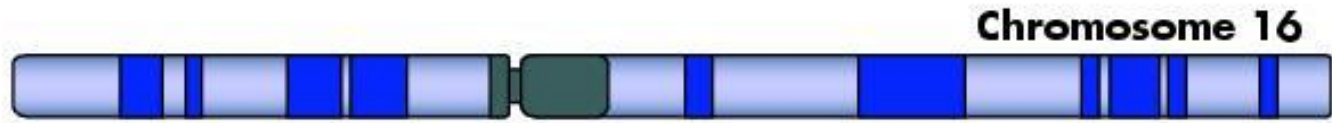
Lesage S et al.
Am J Hum Genet 2002



- Gène NOD-2 code pour un récepteur intracellulaire aux LPS et PDG
- par l'intermédiaire de sa région terminale riche en leucines (LRR).
- Dans l'immunité innée, NOD2/CARD15 intervient:
- à la fois dans l'activation cellulaire par la voie NFκB et synergise l'apoptose cellulaire par la voie de la caspase 9.
- Expression tissulaire restreinte: monocytes-macrophages, cellules de Paneth
- Découverte majeure ces dernières années dans la pathogenèse des maladies inflammatoires cryptogéniques de l'intestin: **Mise en évidence de mutations** du gène NOD2/CARD15 dans les populations caucasiennes de MC.
- **Trois** mutations ont été décrites qui altèrent la fonction de la partie C-terminale de la protéine codée par ce gène. Cette partie de la protéine permet de reconnaître le muramyl-dipeptide: partie élémentaire de toute paroi bactérienne et donc participe à la défense innée (invasion bactérienne).
- découverte a également permis de mieux comprendre le rôle des cellules de Paneth dont la fonction était restée une énigme.
- En effet, ces cellules sécrètent des peptides antibactériens et lorsque la protéine NOD2/CARD15 est déficiente, cette sécrétion est supprimée.
- Le mode exact d'action de la protéine NOD2/CARD15 est encore controversé, mais il semblerait qu'elle assure une régulation à la fois positive et négative de la voie de signalisation du récepteur type Toll (TLR).



CARD15 Mutations associées à la maladie de Crohn



- R702W (Arg702 Trp), G908R (Gly908Arg) ainsi qu'une insertion de cytosine (1007 insC),
- présence d'un allèle muté augmente le risque de développer la maladie de Crohn de 2 à 4 fois
- présence de 2 allèles mutés de 15 à 40 fois
- Mutations présentes chez environ 1/3 des MC (40% MC) et formes iléales

(Gastroenterology2002;122)

- Moins de 2 % des individus avec 2 allèles mutés développent une MC
- **20 %** des contrôles **sains** dans les populations caucasiennes sont porteurs d'un allèle muté et **1 %** de 2 allèles mutés
- Mutations du gène NOD2/CARD15 ne sont ni nécessaires ni suffisantes pour le développement d'une MC



OBJECTIFS: RECHERCHER CERTAINS POLYMORPHISMES

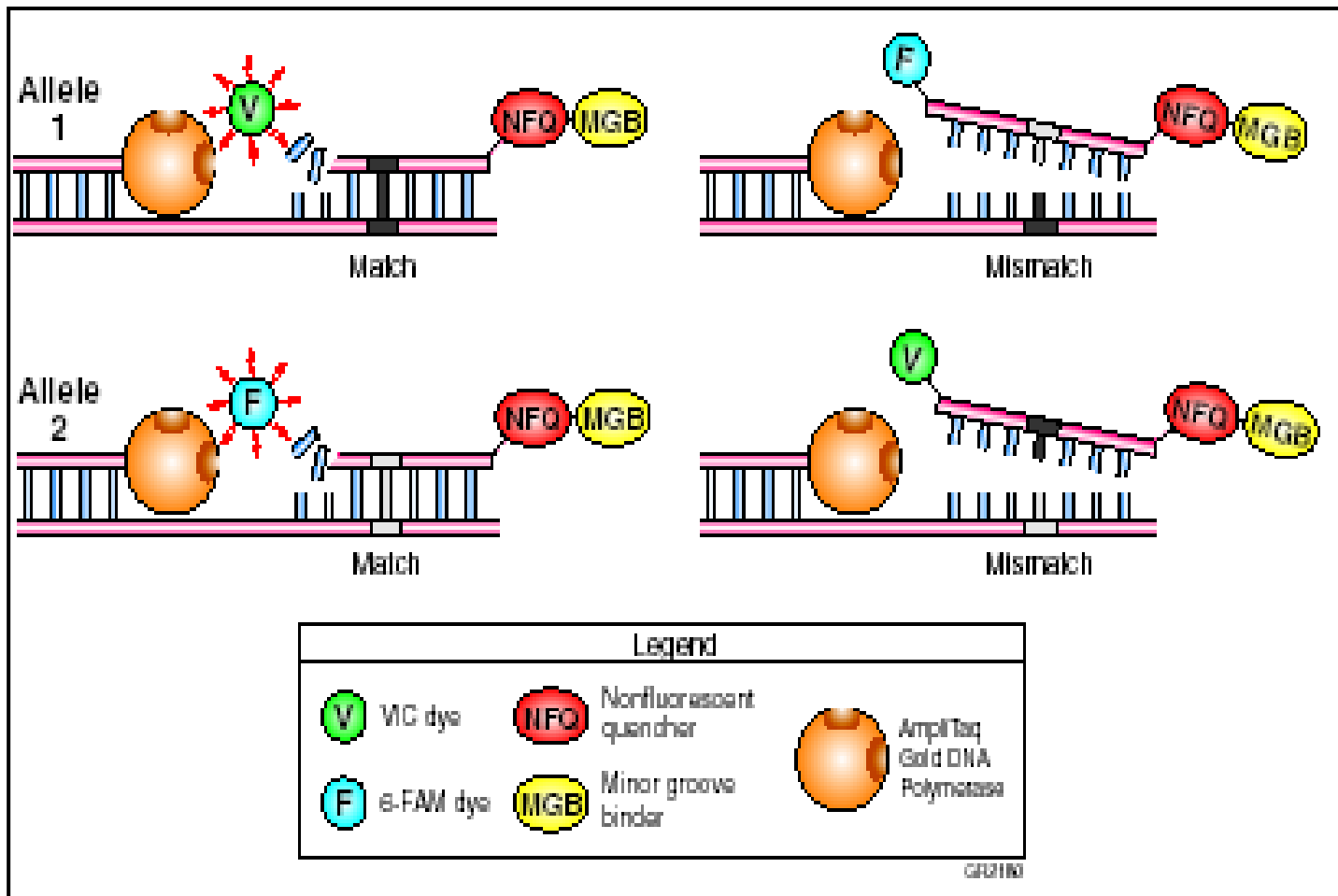
- Les polymorphismes des gènes représentent des variants moléculaires d'une même protéine.
- Au cours de l'inflammation, les polymorphismes des gènes des protéines impliquées positivement ou négativement vont donner des variations dans l'expression phénotypique (gravité) des maladies.



MÉTHODE

- ***Génotypage par hydrolyse de sondes fluorescents (Taqman® SNP Genotyping Assays)***
- Cette technique permet de réaliser des réactions multiplexes en utilisant, dans une même réaction, des fluorochromes émetteurs distincts liés à des sondes différentes.
- Les typages alléliques ont été réalisés en ayant recours à des sondes fluorescentes Taqman® MGB marquées avec des fluorochromes différents pour chaque allèle étudié. Les marqueurs fluorescents utilisés sont le VIC™ et le FAM™.





L'analyse et la lecture de la fluorescence se fait en point final avec l'appareil ABI 7000 (Applied Biosystems) en considérant qu'une augmentation du signal

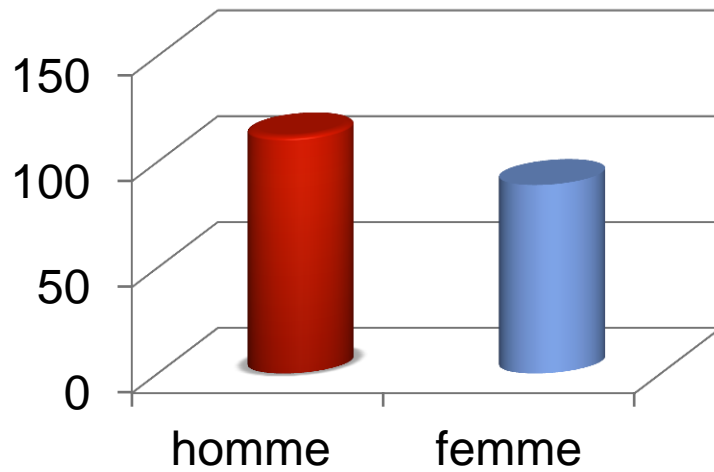
- *en VIC uniquement indique une homozygotie pour l'allèle 1,
- en FAM uniquement indique une homozygotie pour l'allèle 2,
- en VIC et en FAM une hétérozygotie.



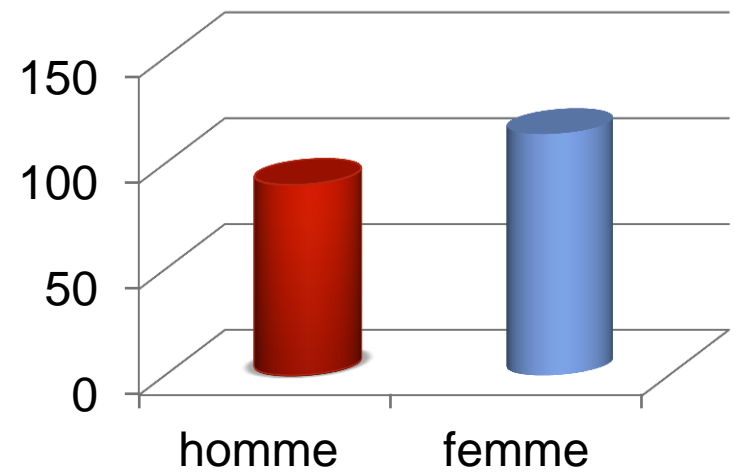
MATÉRIELS

POPULATION

Témoin



MC



CARACTÉRISTIQUES POPULATION MC

- 77% âge de début de la maladie avant 40ans:A1
- 33% âge de début de la maladie après 40 ans:A2
- 23% L1
- 24% L2
- **51% L3**
- 2% L4
- 40% MEI(30% articulaires)
- 15% HF



RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

1/ Polymorphisme *NOD2/CARD15 R702W*

l'allèle W est plus fréquent chez les patients MC

($\chi^2= 17.205$, $P_c=0.00003$, $OR=12.05$)

Le génotype (RW+WW) est supérieur dans le groupe
MC

($\chi^2= 16.739$, $P_c=0.00004$, $OR=12.5$)



RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

2/ Polymorphisme NOD2/CARD15 G908R

l'allèle R est plus fréquent chez les patients

($\chi^2= 8,630$, $Pc=0,003$, $OR=0,08$).

La fréquence du génotype GG est inférieure chez les
MC

($\chi^2= 8,785$, $Pc=0,003$, $OR=0,07$)



RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

- les deux polymorphismes étudiés (G908R et R702W) sont impliqués dans la MC chez la population algérienne.
- Les études de corrélation génotype/phénotype ont permis de montrer que les sujets porteurs de mutations, en particulier les sujets doublement mutés, avaient certaines caractéristiques, comme l'âge de début plus précoce
- L'allèle W et le génotype (WW, RW) sont plus fréquents chez les patients MC avec un âge de début de manifestations cliniques précoce
- La valeur diagnostique du génotypage de CARD15/NOD2 ne permet pas, aujourd'hui, de remettre en question les outils diagnostiques classiques



RÉSULTATS ET DISCUSSION

Polymorphismes Toll-like Receptor-2 -16934 A/T et -596 T/C

- L'analyse génotypique, allélique et phénotypique des polymorphismes étudiés ne révèle aucune différence significative entre les patients MC et les témoins
- Nos résultats n'ont montré aucune différence significative pour les polymorphismes du gène TLR2 étudiés entre le groupe MC et les témoins
- Ils n'interviennent ni dans la susceptibilité à la MC, ni dans ses différents phénotypes cliniques dans notre population



CONCLUSION

- Les deux polymorphismes de NOD2 sont fortement associés à la MC, et sont, par conséquent, de puissants gènes de susceptibilité à la MC dans la population algérienne. Ceci confirme la plupart des études qui font de ce gène un élément de susceptibilité majeur

